

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MICROBIÓLOGO**

**Diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol  
común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia de Loja, Ecuador, 2013**

**FRANCISCO JAVIER CORNEJO ESPINOZA**

**DIRECTORA: Mtr. JENIFFER YÁNEZ ALTUNA**

**QUITO, 2014**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, FRANCISCO JAVIER CORNEJO ESPINOZA, C.I. 171861644-2, autor del trabajo de graduación intitulado: DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS RELACIONADOS CON LESIONES NECRÓTICAS EN FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN LA PROVINCIA DE LOJA, ECUADOR, 2013 previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



FRANCISCO JAVIER CORNEJO ESPINOZA,

C.I. 171861644-2

## **DEDICATORIA**

A Dios

A su Hijo, Nuestro Salvador Jesús

A Mi Familia

A Mi Futura Esposa

A mis Amigos

A la PUCE

Al Ecuador

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios, por su gran amor y misericordia hacia nosotros. Tanto es su amor que envió a su único hijo como ofrenda perfecta para salvarnos y darnos la vida eterna.

A mi familia por su apoyo incondicional. Especialmente a mi madre Mónica, una mujer luchadora, cariñosa y única.

A mi novia María Augusta, por estar siempre a mi lado, por ser mi soporte, mi mejor amiga y mi gran amor. Fue tanto su apoyo que incluso estuvo presente y me ayudó en mis largos días en el laboratorio.

A mi directora de disertación, Ingeniera Jeniffer Yánez, por su constante apoyo, confianza y amistad a lo largo de mi carrera y en esta investigación.

A la escuela de Bioanálisis de la PUCE, por brindarnos toda la infraestructura necesaria para realizar esta investigación. Y a todos los profesores de la carrera de Microbiología que supieron compartir su conocimiento durante todo este trayecto universitario.

También quiero agradecer de una manera muy especial a Carla Garzón PhD. y a sus estudiantes de OSU por su amistad, ayuda y entrenamiento en la identificación molecular de hongos.

Y por último, agradezco a todos mis amigos que desde el colegio me han brindado su amistad, al igual que a mis amigos y compañeros universitarios que son y serán muy importantes para mí.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| Contenido  |    |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | 7  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | 8  |
| ÍNDICE DE ANEXOS .....   | 9  |
| RESUMEN .....  | 10 |
| ABSTRACT.....  | 11 |
| CAPÍTULO I .....   | 1  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| 1.1. Objetivos .....   | 4  |
| 1.1.1. Objetivo General.....                                     | 4  |
| 1.1.2. Objetivos Específicos.....                                | 4  |
| CAPÍTULO II.....   | 5  |
| 2. MARCO TEÓRICO.....  | 5  |
| 2.1. Antecedentes .....  | 5  |
| 2.2. Hongos Endófitos.....                                       | 7  |
| 2.2.1. Hongos Endófitos No Clavicipitaceous (Endófitos NC) ..... | 8  |
| 2.3. Hongos Endófitos en Leguminosas.....                        | 13 |
| 2.4. Fréjol Común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....           | 15 |
| 2.5. Hongos Endófitos en Fréjol .....                            | 16 |
| 2.6. Lesiones Necróticas.....                                    | 16 |
| 2.7. Identificación de hongos .....                              | 17 |
| 2.8. Espaciadores Internos Transcritos (ITS).....                | 18 |
| 2.9. Biodiversidad .....   | 18 |
| 2.10. Índices de Diversidad .....                                | 19 |
| 2.11. Filogenética .....   | 19 |
| 2.12. <i>Neighbor-Joining</i> .....                              | 20 |
| 2.13. <i>Bootstrap</i> .....                                     | 20 |
| CAPÍTULO III.....  | 22 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                     | 22 |
| 3.1. Tipo de Estudio y Técnica de Muestreo.....                  | 22 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Diseño del Experimento .....  | 23 |
| 3.2. Equipos y Materiales .....  | 23 |
| 3.2.1. Equipos usados en el estudio .....  | 23 |
| 3.2.2. Materiales usados en el estudio.....  | 24 |
| 3.3. Técnicas Empleadas: .....   | 25 |
| 3.3.1. Recolección de Muestras .....   | 25 |
| 3.3.2. Transporte al Laboratorio. ....   | 27 |
| 3.3.3. Procesamiento de las Muestras .....   | 27 |
| 3.3.4. Análisis de Secuencias .....  | 32 |
| 3.3.5. Índices de Diversidad.....  | 33 |
| 3.3.6. Construcción del Árbol Filogenético .....   | 33 |
| CAPÍTULO IV .....  | 34 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 34 |
| 4.1. Aislamiento de Hongos Endófitos de Hojas, Vainas y Tallos. ....                       | 34 |
| 4.2. Concentración y Pureza de ADN .....   | 35 |
| 4.3. Amplicones de las secuencias ITS .....  | 37 |
| 4.4. Identificación Molecular de los Hongos Endófitos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. .... | 38 |
| 4.5. Diversidad de Hongos Endófitos en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....                    | 43 |
| 4.6. Análisis Filogenético de los Endófitos Fúngicos. ....                                 | 48 |
| CONCLUSIONES .....   | 53 |
| RECOMENDACIONES .....  | 54 |
| REFERENCIAS.....   | 55 |
| ANEXOS .....   | 63 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Localización de las regiones ITS. White et al., 1990 .....  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Vaina de fréjol con lesión necrótica en su lado superior izquierdo. Cornejo, 2013.....  | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Recolección y etiquetado de muestras.....   | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Desinfección superficial de tejidos de fréjol. Cornejo, 2014. ....  | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Presencia de conidios y micelio fúngico ( <i>Alternaria</i> sp., 40x). Cornejo, 2014. ....  | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Hongos endófitos aislados de 3 cantones en la provincia de Loja. Cornejo, 2014. ....  | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Visualización de los amplicones de la región ITS. Cornejo, 2014.....  | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Índice de Shannon ( $H'$ ) de los cantones Loja, Saraguro, Paltas y el Índice total de la provincia de Loja. Cornejo, 2014 .....  | 46 |
| <b>Figura 9.</b> Índice de Simpson (D) de los cantones Loja, Saraguro, Paltas y el Índice total de la provincia de Loja. Cornejo, 2014 .....   | 47 |
| <b>Figura 10.</b> Árbol filogenético correspondiente a la relación de los hongos endófitos aislados de lesiones necróticas en <i>Phaseolus vulgaris</i> L., en la provincia de Loja. Cornejo, F. 2014..... | 50 |
| <b>Figura 11.</b> (A) Conidios pertenecientes al género <i>Epicoccum</i> . (B) Conidios pertenecientes al género <i>Boeremia</i> . Cornejo, 2013. ....   | 51 |
| <b>Figura 12.</b> Características macroscópicas de 3 especies distintas de hongos endófitos pertenecientes al género <i>Fusarium</i> . Cornejo, F. 2014. ....  | 52 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clases de hongos endófitos no clavicipitaceous y sus criterios de caracterización. ....  | 8  |
| <b>Tabla 2.</b> Volúmenes y reactivos utilizados para el Master Mix. Garzón, 2013 (comunicación personal). ....  | 30 |
| <b>Tabla 3.</b> Protocolo N°1 estandarizado para la amplificación de la región ITS del ADN de hongos en el proyecto I13119, PUCE. Cornejo, 2014. ....  | 31 |
| <b>Tabla 4.</b> Protocolo estandarizado para amplificar la región ITS del ADN de hongos en el Laboratorio de fitopatógenos de la Rizósfera, OSU, USA. Garzón, 2013 (comunicación personal). ....                 | 31 |
| <b>Tabla 5.</b> Medidas de la concentración y pureza del ADN. Cornejo, 2013. ....  | 35 |
| <b>Tabla 6.</b> Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en vainas (VL) y hojas (HL) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. pertenecientes al cantón Loja. Cornejo, 2014. ....    | 38 |
| <b>Tabla 7.</b> Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en hojas (HS) y vaina (VS) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. pertenecientes al cantón Saraguro. Cornejo, 2014. .... | 39 |
| <b>Tabla 8.</b> Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en hojas (HP) y tallo (TP) en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. pertenecientes al cantón Paltas. Cornejo, 2014. ....   | 39 |
| <b>Tabla 9.</b> Número de hongos endófitos identificados en tres cantones de la provincia de Loja y cuantificación de especies. Cornejo, 2014. ....  | 44 |



## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1.</b> Cortes de tejidos de plantas y desinfección .....                 | 63 |
| <b>Anexo 2.</b> Fórmula y Método de preparación de APD (Agar Papa Dextrosa) ..... | 64 |

## RESUMEN

La diversidad de hongos endófitos en lesiones necróticas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado en diversos cantones de la provincia de Loja fue evaluada. Cien muestras fueron procesadas en los laboratorios de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Un total de sesenta hongos fueron aislados e identificados, los cuales fueron obtenidos de tejidos de hojas, vainas y tallos. La identificación molecular de estos microorganismos se realizó mediante secuenciación de la región ITS (Espaciadores Internos Transcritos) de los genes ribosomales. Las secuencias fueron comparadas con aquellas disponibles en el Banco de Genes del NCBI mediante la herramienta BLAST, obteniendo así porcentajes de similitud entre el 98% y 100%. Como resultado se encontró veinte y ocho especies distintas, las cuales fueron tomadas como nuestras unidades operacionales taxonómicas (OTUs). Los índices ecológicos de Shannon y Simpson fueron utilizados en este estudio para determinar la diversidad de hongos endófitos en el fréjol común. En general, la diversidad de los hongos endófitos fue elevada (1,28) y las especies dominantes fueron *Epicoccum nigrum*, *Boeremia telephii*, *Fusarium* sp. y *Alternaria tenuissima*, conocidos todos como endófitos típicos y productores de atractivos metabolitos de gran beneficio para la planta y con interés biotecnológico. La construcción del árbol filogenético utilizando el método de *Neighbor-Joining* arrojó ocho agrupamientos, de los cuales seis pertenecieron al filo *Ascomycota*, uno a *Basidiomycota* y el octavo fue el grupo externo.

## ABSTRACT

The diversity of endophytic fungi in necrotic lesions of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different sites of the province of Loja was evaluated. One hundred samples were processed in the laboratories of the School of Bioanalysis at the Pontifical Catholic University of Ecuador (PUCE). Sixty fungi were isolated and identified from leaf, pod, and stem tissue. The molecular identification of these organisms was performed by sequencing of the ITS region (Internal Transcribed Spacer) of the ribosomal genes. The sequences were compared with those available in the NCBI GenBank by the BLAST tool, obtaining similarity percentages between 98% and 100%. Twenty eight different species were observed and taken as our Operational Taxonomic Units (*OTUs*). The ecological Shannon and Simpson indices were used in this study to determine the diversity of endophytes in the common bean. Overall, the diversity of endophytes fungi was high (1.28) and the dominant species were *Epicoccum nigrum*, *Boeremia telephii*, *Fusarium* sp., and *Alternaria tenuissima*, all of them are known as typical endophytes and as producers of interesting metabolites of great benefit to the plant and with biotechnological interest. The construction of the phylogenetic tree using the Neighbor-Joining method showed eight clusters of which six belonged to the phylum *Ascomycota*, one to *Basidiomycota* and the last one was the outgroup.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

*Phaseolus vulgaris* L., comúnmente conocido como fréjol, es una de las principales leguminosas que se produce, consume y estudia en el Ecuador de ahí su gran significancia (Peralta, Murillo, & Pinzón, 1997; Peralta, Murillo, Falconí, Mazón, & Pinzón, 2007; INIAP, 2011). Su relevancia va más allá de las fronteras ecuatorianas, ya que es la tercera leguminosa más sembrada a nivel mundial con un promedio de 19,19 millones de toneladas anuales (León, 2009). La provincia de Loja produce un porcentaje significativo (15 %) de este cultivo, siendo parte de las 120 000 hectáreas producidas en la región Sierra (Peralta et al., 2007).

La importancia económica, social y ambiental que este cultivo representa es notoria. Siendo así, un destacado ingreso para la agricultura ecuatoriana. Cabe mencionar que es también la leguminosa más consumida a nivel nacional (Peralta et al., 2007). Tan valioso es el fréjol común para el Ecuador que el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) está constantemente desarrollando diversos proyectos para su mejora, tanto a nivel de resistencia a estrés biótico y abiótico como también a su calidad, afirmando de esta manera a la seguridad y soberanía alimentaria del país (INIAP, 2011).

La producción de fréjol en el país ha presentado problemas de bajo rendimiento debido a enfermedades foliares provocadas principalmente por hongos y a estrés abiótico (ej. sequías), provocando grandes pérdidas en la producción. Según reportes del INEC (2002) el rendimiento promedio de fréjol en el país es de 430 kg/ha en monocultivo y 110 kg/ha cuando se cultiva junto al maíz. Sin embargo, al compararse con el rendimiento potencial del cultivo que sobrepasa los 2 000 kg/ha observamos que los rendimientos en Ecuador no son los óptimos (Flores, 2007).

En Ecuador no hay registro de estudios sobre la diversidad de hongos endófitos en fréjol, mientras que alrededor del mundo existen unos pocos trabajos, los cuáles principalmente buscan asociaciones de hongos con la vaina de esta leguminosa o fitopatógenos causantes de

enfermedades (Freitas & Scussel, 2002; Montoya & Castaño, 2009; Vanegas, Gutiérrez, & Marín, 2014). El término endófito incluye a todos los organismos que viven en los órganos de una planta, pudiéndose dar el caso que en algún momento de su ciclo de vida colonicen tejidos internos del huésped. Cualquier patógeno en estado de latencia que se encuentre habitando dentro de la planta también se lo considera como un organismo endófito (Petrini, 1991).

Los hongos endófitos son microorganismos ubicuos, los cuales en su mayoría forman parte del Reino Fungi y se encuentran constituidos por las divisiones *Ascomycota*, algunos *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota* (reino Protista) (Xiang & Liang-Dong, 2012). Por lo general, los *Ascomycotas*, saprofitos mutualistas, son los que más abundan aunque se ha visto que también pueden presentar un comportamiento patógeno en condiciones desfavorables o en otras plantas distintas a su hospedero (Arnold, 2007). Esto se debe a que la relación planta-hongo es muy delicada, un desequilibrio por más pequeño que sea puede provocar la transformación de un estado simbiótico a uno patógeno (Petrini, 1991; Arnold, 2007; Xiang & Liang-Dong, 2012). Los endófitos fúngicos tienen un gran impacto sobre su huésped, el ambiente y el hombre, ya que poseen el potencial de producir diversas sustancias bioactivas tales como antitumorales, antivirales, etc., también reciclan la materia orgánica, previenen del ataque de herbívoros a su planta hospedera, promueven el crecimiento de esta y mejoran su resistencia al estrés ambiental, así como a diversos patógenos incluidos otros hongos (Seena & Sridhar, 2004; Jaber & Vidal, 2009; Xiang & Liang-Dong, 2012; Selim, El-Beih, AbdEl-Rahman, & El-Diwany, 2012).

Junto al conocimiento que dentro de este grupo de endófitos se encuentran patógenos, se ha incitado a reconsiderar por parte de fitopatólogos y epidemiólogos la posibilidad de que algunos fitopatógenos son latentes en su hospedador por un periodo de tiempo (Petrini, 1991).

Por otra parte, las lesiones necróticas en su mayoría son provocadas por infecciones de microorganismos patógenos, en especial por hongos. Aunque se ha estudiado también que varios compuestos químicos y/o el déficit de nutrientes son también los causantes de la muerte vegetal (Agrios, 2005).

Es de suma importancia el aislamiento de hongos endófitos para caracterizarlos, conocer la diversidad de especies, estudiar la dinámica de poblaciones e incluso para usarlos como inóculo que mejora el crecimiento y salud de su hospedador. También al estudiarlos se podrían identificar distintos metabolitos secundarios, producidos por estos, para su posterior aplicación biotecnológica (Xiang & Liang-Dong, 2012), sin excluir la posibilidad de usarlos como vectores de genes de resistencia y otros genes benéficos a ser introducidos en cultivos de importancia económica (Petrini, 1991).

Actualmente, el Espaciador Transcrito Interno, comúnmente conocido por sus siglas ITS en inglés (Internal Transcribed Spacer), es probablemente el "fragmento de ADN más secuenciado" en hongos (Rodríguez, 2007, p. 22); gracias a que esta región presenta alta probabilidad de obtener exitosas identificaciones a una amplia variedad de hongos, debido a su gran variabilidad entre especies lo que nos brinda especificidad (Schoch et al., 2012).

Por lo expuesto anteriormente, el presente estudio busca resolver la siguiente interrogante: ¿Cuál es la diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en el fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia de Loja, Ecuador en el año 2013? La información obtenida permitirá conocer a los endófitos que están íntimamente relacionados a esta leguminosa, ligados a lugares y épocas de cultivo específicos y su posible papel en la producción de lesiones necróticas en la planta.

## 1.1. Objetivos

### 1.1.1. Objetivo General

- Determinar la diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia de Loja, Ecuador en el año 2013.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Aislar hongos endófitos de hojas, vainas y tallos relacionados a lesiones necróticas en fréjol común.
- Identificar a los hongos endófitos presentes en los tejidos internos del fréjol mediante secuenciación de la región ITS.
- Calcular la diversidad de especies de hongos endófitos mediante los índices ecológicos de Shannon y Simpson.
- Analizar la filogenia de los endófitos fúngicos encontrados mediante *Neighbor-Joining*.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

Los hongos son organismos eucariotas pertenecientes al Reino Fungi, productores de esporas, no contienen clorofila, por lo general con reproducción sexual y asexual, formados por filamentos llamados hifas, con pared celular de quitina y nutrición por absorción (Universidad Nacional del Nordeste, 2007). Dentro de este reino los hongos se clasifican en 7 filos (Agrios, 2005; Hibbett, 2007):

- *Chytridiomycota*, hongos que producen células móviles (zoosporas) con un solo flagelo posterior en forma de látigo.
- *Blastocladiomycota*, antiguo miembro del filo *Chytridiomycota*, actualmente reconocido como un nuevo filo que se caracteriza por la producción de zoosporas.
- *Neocallimastigales*, ex miembro también del filo *Chytridiomycota*. Adquiere esta clasificación por diferencias morfológicas y moleculares con su antiguo filo.
- *Glomeromycota*, forma parte del antiguo filo *Zygomycota*. Estos hongos producen esporas asexuales no móviles en estructuras llamadas esporangios. Las esporas descansan en otra estructura, característica del ex filo, conocida como zigosporas.
- *Ascomycota* son hongos productores de esporas sexuales (ascosporas) en una estructura conocida como asco. Produce además esporas asexuales no móviles (conidios).
- *Basidiomycota* son hongos productores de esporas sexuales llamadas basidiosporas, en una estructura llamada basidio.
- *Microspora* son parásitos unicelulares de animales y protistas que presentan mitocondrias muy reducidas.

Por su estilo de vida los hongos son clasificados como parásitos (desarrollo a expensas de otros organismos vivos a los que causan lesiones y en ocasiones la muerte), saprófitos (descomponedores de materia orgánica) y endófitos (desarrollo en el interior de plantas) (Schulz & Boyle, 2006; Fraile & Oria, 2014).



En Ecuador, la leguminosa más importante es el fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Peralta et al., 1997) cultivo primordialmente sembrado en la región Sierra, donde existe una producción del 90%. Loja, ubicada en la Sierra ecuatoriana es la segunda provincia con mayor producción de fréjol con un total del 15% a nivel nacional (Peralta et al., 2007).

La planta huésped y la ubicación geográfica de la misma son los responsables en la formación de comunidades de endófitos foliares, las cuales comúnmente están compuestas por una mezcla de especies generalistas usuales. Se ha observado en distintos estudios que existe una prevalencia de *Ascomycota* entre los diferentes hongos endófitos foliares (Arnold, 2007).

En un estudio realizado por González (2003) con el objetivo de probar la efectividad de algunos antifúngicos y antibacterianos para la desinfección de semillas de *Phaseolus vulgaris* L., se lograron aislar distintos géneros de hongos. Entre los más abundantes se encuentran *Alternaria* y *Cladosporium*. Otros microorganismos presentes en la semilla de fréjol fueron *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* spp., *Botryotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Stemphylium* spp. y *Trichothecium roseum*.

De igual forma Montoya y Castaño (2009) encontraron diversos hongos endófitos en granos de esta misma leguminosa entre ellos *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Alternaria* sp., siendo el más prevalente *Fusarium* sp.

Mientras que en otras leguminosas tales como *Canavalia cathartica* y *C. maritima* se determinó como principal endófito a *Chaetomium globosum*, el cuál estuvo presente en raíces, tallos y hojas. También se consiguió aislar distintos hongos entre ellos, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Colletotrichum* spp., *Phoma* spp., *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Curvularia* spp., *Acremonium* spp., *Cadaphora* spp., *Nigrospora* spp., *Coelomycete* spp., *Phomopsis* spp., *Codinaea* spp., *Pestalopsis* spp., *Mucor* spp. y *Dreschelera* spp. (Seena & Sridhar, 2004).

Así también, Anita y Sridhar (2009) al igual que Seena y Sridhar (2004) estudiaron la diversidad fúngica endófito en cinco tejidos (raíz, tallo, vaina, semilla y hoja) de *Canavalia*

*cathartica*, encontrando en total 36 hongos endófitos de ellos el más abundante en todos los tejidos fue *Aspergillus niger* seguido por *Penicillium chrysogenum*, *A. flavus* y *Fusarium oxysporum*. Entre otros hongos aislados se encuentran *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Chaetomium* spp., *Nigrospora* spp., *Drechslera halodes*, *Penicillium* spp., *Scytalidium lignícola*, *Curvularia* spp., *Eurotium chevalieri*, *Mucor* spp., *Phytophthora* spp., y *Rhizopus* spp.

## 2.2. Hongos Endófitos

Por más de cien años, gracias a diversos estudios científicos, se sabe que en la naturaleza la mayoría de plantas existentes, si no todas, comparten una simbiosis con muchos hongos endófitos. Este amplio grupo de hongos tiene un gran impacto sobre éstas, como por ejemplo en su ecología, rendimiento y evolución. Ayudando a formar comunidades de plantas y afectando en sobremanera a la estructura de la comunidad y pluralidad de organismos asociados (Rodríguez, White, Arnold, & Redman, 2009). De igual forma, los metabolitos producidos por estos endófitos juegan un rol importante, ya que afectan al ecosistema de la comunidad. Por ejemplo, estos metabolitos secundarios pueden ser antibióticos (contra patógenos u organismos competidores), tóxicos contra insectos, herbívoros vertebrados o incluso fitotóxicos (Prado, Li, & Nay, 2012).

Sobre el impacto que tienen estos microorganismos en el rendimiento de las plantas, vemos que poseen la capacidad de mejorarla al otorgar tolerancia al estrés biótico y al abiótico, así como ayudando al aumento de su biomasa y a disminuir la demanda de agua (Rodríguez et al., 2009).

Distintos a las micorrizas (hongos micorrícicos) los cuales residen en las raíces de las plantas y crecen en la rizósfera, los hongos endófitos colonizan el interior de los tejidos vegetales, así se desarrollan en el interior de hojas, tallos y/o raíces (Rodríguez et al., 2009).

Usualmente los hongos endófitos son clasificados en dos amplios grupos, los **clavicipitaceous**, colonizadores de gramíneas y los **no clavicipitaceous**, encontrados en tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos, aliados, coníferas y angiospermas (Hyde & Soyong, 2008; Rodríguez et al., 2009). Dentro de este último grupo de endófitos se

encuentran los colonizadores de *Phaseolus vulgaris* L., perteneciente a la división de las angiospermas.

### 2.2.1. Hongos Endófitos No Clavicipitaceus (Endófitos NC)

Los hongos endófitos no clavicipitaceus presentan gran diversidad constituyendo un conjunto polifilético formado principalmente por *Ascomycetes*, los cuales cumplen varios papeles ecológicos. Estos endófitos han sido aislados en plantas de todos los ecosistemas terrestres, desde los trópicos hasta la tundra. Dentro de este amplio grupo de hongos se diferencian las clases 2, 3 y 4, fundamentados en modelos de colonización, mecanismos de transmisión entre generaciones de plantas, niveles de biodiversidad y funciones ecológicas. Las tres clases de endófitos NC presentan un amplio espectro de hospederos. Los organismos dentro de la clase 2 pueden desarrollarse en tejidos aéreos y subterráneos (raíces y rizoma), a diferencia de las clases 3 y 4 que están limitados a tejidos sobre el suelo y por debajo del mismo, respectivamente. Sobre la colonización del huésped también existe diferencia entre estas, los de la clase 3 forman infecciones localizadas, distinto de las clases 2 y 4 que son capaces de colonizar de manera más amplia los tejidos (Rodríguez et al. 2009).

En la tabla 1 se resumen los criterios para caracterizar a las tres clases pertenecientes a los hongos endófitos NC.

**Tabla 1.** Clases de hongos endófitos no clavicipitaceus y sus criterios de caracterización.

| Criterio                                 | Clase 2                                | Clase 3    | Clase 4      |
|--|--|------------|--------------|
| Rango de huésped                         | Extenso                                | Extenso    | Extenso      |
| Tejido colonizado                        | Brotes (tallo, hojas), raíces y rizoma | Brotes     | Raíces       |
| Colonización en la planta                | Extenso                                | Limitado   | Extenso      |
| Biodiversidad en la planta               | Baja                                   | Alta       | No se conoce |
| Transmisión                              | Vertical y horizontal                  | Horizontal | Horizontal   |
| Beneficios en estado físico del huésped* | NAH y AH                               | NAH        | NAH          |

\*NAH: no adaptadas al hábitat, AH: adaptadas al hábitat. (Rodríguez et al., 2009).

La diversidad de la clase 2 de endófitos en general en un mismo huésped es limitada (Rodríguez et al., 2008) mientras que la diversidad en los hongos clase 3 en un mismo huésped o tejido puede ser muy elevada (Arnold et al., 2003). Sobre la diversidad de la flora fúngica pertenecientes a la clase 4 falta profundizar (Rodríguez et al., 2009).

Las tres clases de endófitos son transmitidos horizontalmente, a excepción de la clase 2 que también pueden transmitirse verticalmente (ej. por semillas) (Rodríguez et al., 2009).

Sobre los beneficios asignados al huésped por el endófito, se los ha definido como adaptado al hábitat (AH) si estos otorgan tolerancia a un estrés que se da como resultado de una presión específica selectiva presentes en tal medio (pH, temperatura, salinidad, etc.), o como no adaptadas al hábitat (NAH) si el beneficio dado es independiente al dicho hábitat (Rodríguez et al., 2009). Dentro de las tres clases se ha estudiado en profundidad que la clase 2 confiere ambas características benéficas relacionadas con el hábitat (Rodríguez et al., 2008).

Varios endófitos NC establecen relaciones mutualistas con plantas, otorgándoles beneficios en su salud física como es la tolerancia a estrés (biótico y abiótico), ayudando a la adquisición de nutrientes e incrementado su crecimiento (Arnold et al., 2003; Rodríguez et al., 2008).

Los organismos no clavicipitaceous han sido tratados como un solo grupo, sin embargo, es por su alta diversidad fúngica, interacciones ecológicas, características de vida y de más rasgos que se los clasifica en los tres grupos funcionales previamente explicados (Rodríguez et al., 2009).

#### 2.2.1.1. *Hongos Endófitos No clavicipitaceous Clase 2*

Se encuentran constituidos por varias especies, miembros todas del subreino *Dikarya* (*Ascomycota* o *Basidiomycota*). Siendo la mayoría parte de división *Ascomycota*. Esta clase es capaz de provocar infecciones extensas dentro de su planta huésped. Su transmisión se da mediante semilla y/o rizomas, no se presentan en abundancia en la rizósfera, además tienen altas tasas de infección (90–100%) en plantas que se

desarrollan en hábitats con alto estrés. A diferencia de los otros endófitos NC, la clase 2 puede colonizar raíces, hojas y tallos (Rodríguez et al., 2009).

Los estudios demuestran que algunos de estos endófitos NC incrementan la biomasa de raíces y brotes de sus huéspedes, otorgan tolerancia a mucho estrés biótico y abiótico, como son las enfermedades, desecación, temperatura, etc. (Rodríguez et al., 2009).

#### - *Ciclo de Vida*

Como en el caso de todos los endófitos, la colonización de sus plantas huéspedes se da por vía infectiva mediante estructuras fúngicas como el apresorio o por penetración directa del tejido usando sus hifas (Ernst, Mendgen, & Wiersel, 2003). Solamente si su huésped se encuentra en un estado de senescencia, los microorganismos colonizadores emergerán y esporularán, ya que comúnmente se desarrollan intercelularmente. Cabe mencionar que estos hongos endófitos son cultivables, pudiendo crecer en una variedad de medios de cultivo (Rodríguez et al., 2009).

#### - *Beneficios*

Algunos endófitos evitan el estrés de su planta huésped a través de simbiosis. Por ejemplo, *Curvularia protuberante* coloniza a la planta geotérmica *Dichanthelium lanuginosum* (Márquez, Redman, Rodríguez, & Roossinck, 2007), donde gracias a esta simbiosis se puede dar la supervivencia de ambos organismos en ambientes con temperaturas que oscilan los 65°C. Si en esta relación no existiera ni el hongo ni el vegetal podría sobrevivir a temperaturas superiores a los 40°C. Otros microorganismos clase 2 son mutualistas, otorgando así un beneficio en el estado físico de su huésped, permitiéndolo adaptarse a distintas condiciones ecológicas mientras reciben nutrientes por parte de la planta para su crecimiento y reproducción (Rodríguez et al., 2009).

En varios estudios se ha visto que gran parte de los endófitos clase 2 ayudan al aumento de biomasa vegetal. Este efecto positivo puede estar dado gracias a que el hongo induce a su huésped a producir hormonas. Otra probable explicación es que el microorganismo sintetiza hormonas vegetales relacionadas. Muchos hongos clase 2 protegen su planta contra patógenos fúngicos, demostrando su capacidad para producir metabolitos secundarios, parasitar otros hongos o para inducir resistencia sistémica vegetal. Existe también la posibilidad a que esta resistencia se deba a una competencia por el nicho o por recursos entre los hongos endófitos y los patógenos. La persistencia de esta clase en el tiempo y su distribución ubicua son una prueba de su importancia en la ecología y evolución de las plantas (Rodríguez et al., 2009).

#### 2.2.1.2. *Hongos Endófitos No Clavicipitaceous Clase 3.*

Los hongos endófitos no clavicipitaceous clase 3 se diferencian de las otras clases principalmente en su desarrollo que se da únicamente en los tejidos aéreos de su huésped. Otras características de esta clase son la transmisión horizontal, infecciones localizadas, potencial para conferir beneficio en su huésped sin que haya especificidad de hábitat y extrema diversidad en la planta. En biomas que va desde bosques tropicales hasta el ártico existe una hiper-diversidad de esta clase de hongos endófitos presentes en variedad de plantas tales como árboles tropicales, plantas no vasculares, plantas vasculares sin semillas, coníferas, leñosas y herbáceas angiospermas. También se los ha encontrado dentro de tejidos fotosintéticos, flores, frutas y en madera (Rodríguez et al., 2009).

Una característica muy notable de esta clase de hongos es su elevada diversidad. En bosques panameños, por ejemplo, se los ha encontrado en un 100% dentro de las hojas de los árboles (Arnold, 2002), una hoja puede contener hasta un aislado por cada 2 mm<sup>2</sup> de tejido (Gamboa, Laureano, & Bayman, 2003) que frecuentemente contiene docenas de especies. Mientras que rara vez se los ha aislado de semillas (Arnold et al., 2003).

Se ha observado en muchos casos que los endófitos clase 3 están involucrados en el mejoramiento de la resistencia a enfermedades de la planta, en repeler a herbívoros y en la adaptabilidad a cambios sensitivos a estrés abiótico (Rodríguez et al., 2009).

- *Ciclo de Vida*

Al igual que la clase 2, un buen número de endófitos clase 3 pertenecen al subreino *Dikarya*, siendo la división *Ascomycota* más abundante y dentro de esta, la subdivisión *Pezizomycotina* es la más representativa (Arnold, 2007). Entre biomas y linajes de huéspedes la prevalencia de estos hongos varía marcadamente (Arnold & Lutzoni, 2007).

Su forma de reproducción es por fragmentación hifal y/o por reproducción (sexual o asexual) en tejido muerto o senescente (Herre, Bael, Maynard, & Robbins, 2005). Las esporas e hifas fragmentadas son transportadas por insectos, el viento o la lluvia (Rodríguez et al., 2009).

Estudios demuestran una mayor presencia y diversidad de hongos endófitos no clavicipitaceous clase 3 en los trópicos, sin embargo condiciones abióticas pueden provocar una abundancia inesperada en otras regiones (Arnold & Lutzoni, 2007).

- *Beneficios*

Varios trabajos observan que las plantas infectadas con los hongos pertenecientes a la clase 3 no muestran cambios en su crecimiento, aumento de biomasa u otras características de fácil cuantificación (Arnold, 2002). Y de hecho, muchos otros estudios muestran un impacto negativo en el crecimiento de su huésped. También se ha visto que plántulas influenciadas por condiciones de sequía y que se encuentran asociadas a esta clase de hongos presentan una pérdida más rápida de agua en comparación a plántulas no asociadas, dejando una interrogante en el papel que cumple esta clase en su planta huésped (Rodríguez et al., 2009).

Sin embargo, cabe mencionar que otros estudios han demostrado que estos endófitos reducen la formación de lesiones y muerte de la hoja provocadas por *Phytophthora* sp.

(Arnold et al., 2003). Es posible que el papel de los endófitos clase 3 sea el interactuar con otros organismos involucrados con la planta. De esta manera, la recuperación de hongos entomopatógenos dentro de esta clase nos invita a entender su ecología simbiótica con su huésped (Rodríguez et al., 2009).

### 2.3. Hongos Endófitos en Leguminosas

Seena y Sridhar (2004) analizaron la presencia de hongos endófitos en tres estadios de desarrollo (semillas, plántulas y plantas maduras) de dos leguminosas costeras, *Canavalia cathartica* y *C. marítima*. Para el estudio se muestrearon 5 tejidos de cada estadio (cotiledones, cubierta de semilla, raíces, tallos y hojas), de los cuales tomaron pequeños fragmentos y se los colocó en agar extracto de malta, previa desinfectaron superficial. Como resultado obtuvieron cuarenta y seis taxones fúngicos, entre ellos seis *Ascomycetes*, treinta y tres hongos mitospóricos, dos *Zygomycetes* y cinco morfo especies estériles. También observaron la presencia en un 90% de hongos en raíces, tallos y hojas. No encontraron ninguna distinción significativa en la presencia de endófitos entre las dos especies de plantas analizadas. Descubrieron que los hongos colonizaban más del 90% de plántulas y plantas maduras. De igual forma, observaron que entre los tejidos estaban presentes en un 90% en los fragmentos de raíces, tallos y hojas.

Tanto la diversidad como la riqueza de aislados fue mayor en *Canavalia cathartica*. También se encontró mayor cantidad de especies fúngicas en las plantas maduras de *C. cathartica* y en las plántulas de *C. marítima*, así como en las hojas de ambas especies. Dentro de los resultados, notaron un predominio en la colonización por el hongo endófito *Chaetomium globosum* sobre el 50% de raíces, tallos y hojas en *C. maritime* y por igual porcentaje en raíces de *C. cathartica*, seguido por *Penicillium citrinum* y *Aspergillus* sp. En menores cantidades fueron aislados en ambas plantas los siguientes endófitos *Colletotrichum* spp., *Phoma* spp., *Ryzopus* spp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Curvularia* spp., *Acremonium* spp., *Cadaphora* spp., *Nigrospora* sp., *Coelomycete* sp., *Phomopsis* sp., *Codinaea* sp., *Pestalopsis* sp., *Mucor* sp. y *Dreschelera* spp. (Seena & Sridhar, 2004).



Mientras que Anita y Sridhar (2009) determinaron la diversidad de hongos con y sin desinfección superficial en cinco tejidos (raíz, tallo, hoja, vaina y semilla) pertenecientes a la leguminosa silvestre del manglar *Canavalia cathartica*. Existió gran similaridad de especies entre vainas y semillas, seguido de raíces y vainas; y se vio baja semejanza entre raíces y hojas. Una elevada regularidad al igual que diversidad de especies mostraron los hongos en las raíces. De un total de 40 hongos aislados, se encontró como especie dominante a *Aspergillus niger* en todos los tejidos tanto esterilizados como en los que no se esterilizó con el 29,3% y el 48,5% respectivamente. De ellos 25 se encontraron en hoja y 23 en vaina. En este ensayo se observó una mayor diversidad en hojas.

En total se obtuvieron 36 especies de hongos endófitos, de ellos 15 se presentaron en tallo, 14 en raíz y el mismo número se vio en vaina. Entre las principales especies de microorganismos encontrados tenemos a *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium oxysporum*. Entre los géneros aislados se encuentran *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Nigrospora*, *Drechslera*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Mucor*, *Phytophthora* y *Rhizopus*. De esta manera, los autores concluyen que la frecuencia de hongos presentes no fue distinta entre los tejidos esterilizados y no esterilizados, ya que 16 microorganismos se presentaron en ambos ensayos. Entre los hongos más abundantes constan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium chrysogenum* (Anita & Sridhar, 2009).

Mientras que Pereira, Azevedo y Petrini (1993) estudiaron a la forrajera *Stylosanthes guianensis*, la cual está presente en regiones tropicales y subtropicales de América del sur. El objetivo de esta investigación fue conocer si el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de antracnosis (lesiones oscuras, hundidas, ulcerosas, necróticas en tallo, hoja, fruta o flor de la planta huésped (Agrios, 2005)) en la mencionada planta, se encuentra presente en tejido sano viviendo como endófito, así también se planteó obtener información sobre la microbiota fúngica endófito de la misma.

A lo largo de un año, los investigadores aislaron endófitos de las hojas de plantas jóvenes (dos y cuatro meses de desarrollo) y adultas (tres años de edad) pertenecientes a *S. guianensis*. El estudio realizado en Brasil contó con 100 plantas adultas y 130 plantas jóvenes. Después de la esterilización superficial del tejido foliar y su posterior cultivo en medio nutritivo con antibiótico se obtuvieron treinta hongos endófitos. Entre los identificados

mediante microscopia de luz tenemos a *Alternaria* sp., *Colletotrichum dematium*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Glomerella cingulata*, *Glomerella* sp., *Guignardia* sp., *Nigrospora oryzae*, *Nodulisporium* sp., *Periconiaanam* sp., *Phomopsis* sp., *Sporormiella minima* y *Xylaria* sp. Mientras que un 57% de endófitos no pudieron ser identificados ya que su micelio fue estéril. Es importante mencionar que *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp. y *Xylaria* sp. estuvieron presentes en un 40% de las muestras tomadas. Donde *Phomopsis* sp. tuvo una baja constancia, mientras que *Xylaria* sp. mostró una distribución más o menos constante tanto en plantas jóvenes como en viejas con una frecuencia del 7,5% entre todas las muestras investigadas. En tanto que la presencia de *G. cingulata* (telomorfo de *G. gloeosporioides*), una especie ubicua, ha sido frecuentemente reportada como un endófito en varias plantas y se lo considera como patógeno latente (Pereira et al., 1993).

#### 2.4. Fréjol Común (*Phaseolus vulgaris* L.)

*Phaseolus vulgaris* L., conocida comúnmente con varios nombres tales como fréjol, frijol, judía, poroto, etc. (Ron & Santalla, 2001). A nivel mundial *P. vulgaris* L. ocupa el tercer lugar en superficie de siembra entre las leguminosas de mayor producción (Flores, 2007), con un promedio de 19,19 millones de toneladas de producción anual (León, 2009), además es un cultivo histórico ya que se ha encontrado evidencia arqueológica de su consumo hace más de 5000 años antes de Cristo (Ulloa, Ulloa, Ramírez, & Ulloa, 2011).

Esta planta de ciclo anual, originaria de América específicamente de México, es sembrada en todos los continentes a excepción de la Antártida. Representa una rica fuente de proteína vegetal para el consumo. Tanta es su notabilidad, que muchos investigadores alrededor del mundo, incluyéndose el Ecuador, están trabajando en el mejoramiento de esta especie (Ron & Santalla, 2001; INIAP, 2011; Ulloa et al., 2011).

El fréjol es un miembro de las leguminosas que producen semillas comestibles, siendo así una de las más importantes primordialmente en Centroamérica, Sudamérica y África donde su consumo es masivo (Ulloa et al., 2011).

El cultivo de fréjol común tiene gran interés para los ecuatorianos, ya que representa un ingreso importante en su economía, primordialmente en la región central del país, donde se la

produce casi en su totalidad (Peralta et al., 2007). Lamentablemente, el rendimiento promedio de fréjol en el país es bajo, 430 kg/ha en monocultivo y 110 kg/ha cuando se cultiva junto a maíz, comparándolo con el rendimiento potencial del mismo (2.000 kg/ha). Este problema se debe principalmente al estrés abiótico en los cultivos y a enfermedades foliares (Flores, 2007).

## 2.5. Hongos Endófitos en Fréjol

En Colombia, Montoya y Castaño (2009) preocupados por la problemática que acarrearán distintas enfermedades y plagas a la producción de fréjol decidieron estudiar los principales microorganismos presentes en los granos de esta leguminosa. En total, los investigadores lograron identificar cinco géneros fúngicos entre ellos *Fusarium* que presentó un 71% de incidencia, la más elevada entre todos los aislados, a continuación *Penicillium* y *Rhizopus* ambos con una incidencia del 8%, seguidos por *Rhizoctonia* (7%) y *Alternaria* (4%). Estos resultados presentan gran preocupación principalmente por los hongos productores de micotoxinas como *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus* ya que los granos analizados están a disposición para el consumo humano (Montoya & Castaño, 2009).

Por otra parte, González (2003) probó la efectividad de algunos antifúngicos y antibacterianos al desinfectar semillas de *Phaseolus vulgaris* L. Donde obtuvo distintas especies fúngicas, entre ellas *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botryotrichum* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Stemphylium* spp. y *Trichothecium roseum*. Entre los géneros encontrados en mayor cantidad están *Alternaria* y *Cladosporium*.

## 2.6. Lesiones Necróticas

Las lesiones necróticas en plantas pueden ser producidas por varios factores, los cuales pueden ser bióticos o abióticos. Entre los factores abióticos la falta de nutrientes, por lo general, es la que prima así una deficiencia de magnesio, zinc o manganeso pueden ser las causantes de estos síntomas. Concentraciones muy altas o una excesiva exposición a químicos, tales como cloro, ácido clorhídrico y etileno pueden ser también perjudiciales.

Dentro de los factores bióticos causantes de este tipo de lesiones se encuentran las infecciones por parte de microorganismos patógenos, en especial los hongos. Así, la necrosis tisular se da como resultado de daños físicos y químicos producidos por el hongo, provocando de esta manera la muerte del tejido afectado (Agrios, 2005).

Muchas investigaciones han probado que los patógenos promueven a la formación de etileno por parte de la planta, gracias a sistemas de inducción molecular, lo que provoca una excesiva exposición a altas dosis de este químico, llevando así a la necrosis (Ohtsubo, Mitsuhashi, Koga, Seo, & Ohashi, 1999).

Otro factor importante que ha sido muy estudiado, demuestra que esta sintomatología resulta como una respuesta defensiva por parte de la planta frente a una infección, llamada *Respuesta Hipersensible*. De esta manera, el vegetal secreta sustancias químicas y antibióticas que evitan el desarrollo del patógeno. Vemos así que la planta es la causante de la necrosis de su propio tejido, literalmente se suicida, con el objetivo de aislar y limitar la propagación del invasor a células adyacentes (Agrios, 2005).

## **2.7. Identificación de hongos**

Para la identificación de hongos tradicionalmente se usan dos características significativas, las esporas y las estructuras en donde las esporas son portadas (esporóforos). Estas estructuras pueden ser fácilmente visualizadas en un microscopio de luz. La forma, tamaño, color de las esporas, así como, su disposición en los esporóforos son suficientes para que investigadores expertos puedan identificar a estos organismos a un nivel taxonómico tan alto como el de género. En los últimos años técnicas de inmunoensayo, por lo general, involucrando anticuerpos monoclonales afines a proteínas específicas de ciertos hongos han sido usadas para su identificación (Agrios, 2005).

Los avances de las técnicas moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) del ADN, particularmente el ribosomal, han revolucionado la identificación de hongos. Cabe mencionar que muchos de los cebadores desarrollados en la actualidad son específicos para las secuencias transcritas internas del ADN ribosomal, tal es el caso de los cebadores para la región ITS (Agrios, 2005).

## 2.8. Espaciadores Internos Transcritos (ITS)

Las regiones ITS (por sus siglas en inglés, *Internal Transcribed Spacer*) son parte de un complejo de genes ribosomales (ARNr) presentes en todos los organismos eucariotas. Existen 2 regiones ITS. La primera, ITS1 que se encuentra entre los genes ARNr 18S y 5.8S. Y la segunda, ITS2 que está localizada entre los genes ARNr 5.8S y 28S (Schoch et al., 2012; *Charles River Laboratories International*, 2014) (Figura 1). Como su nombre lo indica, son espaciadores entre los genes ARNr no codificantes que se encuentran conformados por 250 a 300 nucleótidos (White, Innis, Gelfand, & Sninsky, 1990).



**Figura 1.** Localización de las regiones ITS. White et al., 1990

Mientras la secuencia de los genes ribosomales es muy conservada entre las especies, las regiones ITS pueden variar sustancialmente aún entre especies cercanamente relacionadas, debido a que estas cambian rápidamente gracias a su capacidad de acumular mutaciones. Esta variación permite la especificidad de cada organismo en comparación a otro (*Charles River Laboratories International*, 2014). Por esta razón, en la actualidad, la región ITS es el “fragmento de ADN más secuenciado” en hongos (Rodríguez, 2007, p. 22).

## 2.9. Biodiversidad

La biodiversidad o diversidad biológica es la variedad y variabilidad de todos los seres vivos, abarcando también su ecología y los procesos en los que intervienen (Olalde & Aguilera, 1998). Esta a su vez comprende tres niveles: diversidad genética, diversidad de especies y diversidad de ecosistemas (Aguilera & Silva, 2014).

El nivel de diversidad de especies afecta a procesos ecológicos claves y debe mantenerse para permitir la persistencia de los ecosistemas. Así por ejemplo, la diversidad de hongos es crítica, ya que colaboran en la manutención los ecosistemas gracias a la variedad de roles que cumplen (endófitos, saprófitos, parásitos, etc.), ayudando de esta manera a la descomposición de materia orgánica, al ciclo de nutrientes, a la agregación del suelo, como biocontroladores, productores de metabolitos, etc. (Agrios, 2005; Marcial et al., 2012). Para estudios de este tipo (diversidad) se emplean índices ecológicos, tales como el Índice de Shannon y el de Simpson (Marcial et al., 2012).

## 2.10. Índices de Diversidad

En estudios de biodiversidad varios índices ecológicos son usados. Entre los principales exponentes tenemos al Índice de Shannon ( $H'$ ), el cual es una medida que nos indica la baja probabilidad en predecir la identidad del siguiente individuo dentro de una comunidad, conociendo previamente la identidad de algún miembro dentro de esta. Valores de  $H'$  cercanos o superiores a uno nos indican que una comunidad es altamente heterogénea. Otro de los principales Índices de diversidad es Simpson ( $D$ ), el cual nos indica la probabilidad existente de que dos individuos pertenezcan a la misma especie al ser seleccionados al azar en la comunidad, brindándonos de esta manera un valor de dominancia de cierto o ciertos individuos. La Riqueza ( $S$ ) es usada también en este tipo de estudio y representa el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (*OTUs*) encontradas en la comunidad en estudio (Marcial et al., 2012).

## 2.11. Filogenética

La filogenética se refiere al estudio de la filogenia (del griego *phylon*: “tribu, raza” y *geneá*: “nacimiento, origen, procedencia”). La filogenia es una rama de la biología que se encarga de estudiar las relaciones evolutivas entre los organismos, intentando establecer un árbol evolutivo de todos los organismos actuales o extintos (Rodríguez, 2013; Valcárcel, 2014).

Un árbol filogenético es un diagrama ramificado, en el cual se observan las relaciones evolutivas entre los organismos considerados en el mismo. Existen dos tipos de árboles filogenéticos; los primeros con raíz que muestran las relaciones filogenéticas basadas en un ancestro común y los árboles sin raíz que simplemente comparan a los organismos presentes en este, observando así su grado de relación (Martínez & González, 2004; *Institute of Computational Genomics*, 2014; Departamento de Ecología, Genética y Evolución, 2014).

## 2.12. *Neighbor-Joining*

*Neighbor-Joining* (NJ) es un método filogenético utilizado para la construcción de dendogramas (Cañizares & Blanca, 2011) basado en el principio de mínima evolución, el cual tiene como objetivo encontrar y unir pares de secuencias (vecinas) que tengan la menor distancia genética entre sí. De tal forma, estas secuencias vecinas y altamente relacionadas formaran una entidad, paso seguido NJ busca la siguiente secuencia que tenga una baja distancia genética con esta entidad y las unirá hasta formar un dendograma (Saitou & Nei, 1987; Peña, 2011).

El dendograma formado mediante NJ únicamente muestra el grado de similaridad de las secuencias. Es por ello que este método por lo general es usado en estudios de código de barras, debido a que organismos pertenecientes a una misma especie formarán grupos específicos gracias a su alto nivel de semejanza. No está de más recalcar que NJ no se basa en la relación ancestro-descendientes. Es por ello que el árbol obtenido al usar este método no va a reflejar relaciones evolutivas, si no que mostrará el grado de similitud entre los organismos presentes (Peña, 2011).

## 2.13. *Bootstrap*

Método de evaluación basado en el remuestro de los datos de una muestra única (muestra original), buscando así estimar el error de muestreo en un alineamiento múltiple (Vinuesa, 2007).

La prueba de *bootstrap* crea  $n$  número de matrices, basados en la matriz original, mediante muestreos aleatorios, los cuales reposicionan los caracteres de la matriz original creando de esta manera varias matrices. De cada matriz se adquiere uno o varios árboles, donde los árboles más cortos son elegidos y consensuados, obteniendo así un árbol consenso (Solanas & Sierra, 1992).

Las proporciones de *bootstrap* son consideradas como las medidas de apoyo o soporte de cada clado y pueden variar entre el 50 y 100%. Valores más altos muestran un mayor soporte estadístico, proporciones bajas no significan que un clado es falso solo que tiene poco soporte por los datos analizados (D'Elia, 2014).



## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de Estudio y Técnica de Muestreo

El presente estudio se realizó como parte del proyecto “Colección e inventario de hongos microscópicos causantes de enfermedades en cultivos de importancia comercial (fitopatógenos) en la región Sierra Sur del Ecuador”, código J13132. Financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), en el año 2013.

Este estudio es de tipo descriptivo y transversal.

Un total de 100 muestras de hojas, vainas y tallo de *Phaseolus vulgaris* L., con lesiones necróticas fueron recolectadas. El muestreo fue realizado en los meses de abril y noviembre del 2013 en la provincia de Loja, en los cantones: Loja (Latitud: 03°59'35"S- Altitud: 79°12'15"W) donde se recolectaron 38 muestras, Saraguro (Latitud: 03°36'00"S- Altitud: 79°13'00"W) con 27 muestras y Paltas (Latitud: 03°13'00"S - Altitud: 79°11'00"W) con 35 muestras recolectadas.

La selección de las muestras fue intencional, ya que se buscaron plantas de fréjol con lesiones necróticas en los sitios mencionados anteriormente (Figura 2). Se muestreó de manera aleatoria y estratificada de acuerdo a la disponibilidad de plantas.



**Figura 2.** Vaina de fréjol con lesión necrótica en su lado superior izquierdo. Cornejo, 2013.

### **3.1. Diseño del Experimento**

La presente investigación consistió de tres etapas:

- Primera etapa: recolección de órganos vegetales con lesiones de necrosis en campo.
- Segunda etapa: procesamiento de las muestras en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE.
- Tercera etapa: análisis moleculares, filogenéticos y estadísticos de los resultados obtenidos.

### **3.2. Equipos y Materiales**

#### **3.2.1. Equipos usados en el estudio**

- Termociclador: Marca: LABNET; Modelo: MULTIGENE OPTIMAX; Ref. TC-9610; Serie: 1202020.
- Transiluminador con luz ultravioleta: Marca: INVITROGEN; Modelo: BLUE-LIGHT TRANS-ILUMINATOR; Serie: 13110317.
- Microcentrífuga: Marca: LABNET; Modelo: C-2500; Ref. G-6600; Serie: P-101004.
- Cámara de flujo laminar: Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: P-036202; Serie: 004000400.
- Termobloque: Marca: DRY-BATH; Modelo: DB-005; Serie: 919622.
- Cámara electroforética horizontal: Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: MGU-502T; Serie: 006918.
- Cámara fotográfica: Marca: Nokia; Modelo Lumia 900.
- Pipetas automáticas de volumen variable: Marca: LABNET.
- Microondas: Marca: Panasonic.
- NanoDrop2000: Marca: ThermoScientific.
- Microscopio de luz óptica: Marca: Olympus Corporation; Modelo: CX21LEDFS1; Referencia: 1F88793.

- Autoclave: Marca: Market-Forgot.
- Mezclador de vórtice (Vortex): Marca: Heathrow; Modelo: Sprout; Serie: HSA15996.
- Micro-incubadora: Marca: Labnet; Modelo: I-5110; Referencia: NJ07095; Serie: 06091109.

### 3.2.2. **Materiales usados en el estudio**

#### - *Material de campo*

- Fundas plásticas herméticas pequeñas: Marca Ziploc®.
- Papel toalla.
- Tijera podadora.
- Caja térmica (cooler).
- Marcadores
- Cámara de fotos

#### - *Material para cultivo*

- Portaobjetos.
- Cajas de Petri de 15 mm.
- Cajas de Petri de 60 mm.
- Botellas de 1000 mL de vidrio.
- Parafilm.
- Agar Papa Dextrosa 500 g.
- Agar-Agar 500 g.
- Agar Extracto de malta 500 g.
- Alcohol etílico (96%).
- Hipoclorito de sodio (5%)
- Juego de tijeras y bisturís.

#### - *Material para extracción y análisis del ADN*

- Puntas para pipetas, volumen 0,1-10 µl; Marca AXYGEN.
- Puntas para pipetas, volumen 100 µl; Marca AXYGEN.

- Puntas para pipetas, volumen 1000 µl; Marca AXYGEN.
- Microtubos volumen 1,5 ml; Marca AXYGEN.
- Microtubos volumen 2 ml; Marca AXYGEN.
- Microtubos PCR volumen 0,2 ml; Marca AXYGEN.
- Guantes de nitrilo; Marca GESKIN.
- Alcohol antiséptico (96%).
- Toallas de papel.
- *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*; Marca PROMEGA
- *DNA Ladder* 100 pb; Marca: PROMEGA.
- *DNA SYBR® Safe Gel stain*-INVITROGEN.
- Agarosa 500 gramos (Ultra–Pura); Marca INVITROGEN.
- Buffer TAE 10X-PROMEGA.
- Cebadores universales (ITS4, ITS5). Marca INVITROGEN.
- *Go Taq® GreenMaster Mix*. Marca PROMEGA.
- Agua libre de nucleasas. Marca PROMEGA, LOT 0000068977.
- *Blue/Orange 6x Loading Dye*. Marca PROMEGA, LOT00000051462.

### 3.3. Técnicas Empleadas

#### 3.3.1. Recolección de Muestras

Se recolectaron muestras de hojas, tallos y vaina con lesiones necróticas en cultivos de fréjol. Con una tijera podadora se cortó el órgano de la planta afectada y se colocó de forma individual en fundas plásticas herméticas, cada una de las muestras fue correctamente identificada con el lugar de recolección y la fecha (Figura 3).



**Figura 3.** Recolección y etiquetado de muestras.

(A) Recolección de muestras. (B) Hojas de fréjol con manchas necróticas. (C) Hoja con lesión necrótica en una funda plástica. Cornejo, 2014

### 3.3.2. Transporte al Laboratorio

Las muestras fueron transportadas en una caja térmica vía aérea al laboratorio de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, en la ciudad de Quito para su procesamiento inmediato (24 horas).

### 3.3.3. Procesamiento de las Muestras

#### 3.7.3.1. Aislamiento, Purificación y Cultivo de Hongos Endófitos

Las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo reportado por Agrios (2005), detallado a continuación:

- Con un bisturí estéril se realizaron cortes pequeños de las muestras abarcando la zona necrótica y otra sana (Anexo 1).
- Se desinfectó la superficie de cada corte con hipoclorito de sodio al 5% por cinco minutos y posteriormente se los enjuagó tres veces con agua estéril por 30 segundos cada uno. Se comprobó la efectividad del tratamiento realizando improntas de los cortes en agar APD (Agar Papa Dextrosa) (Figura 4 y Anexo 1).



**Figura 4.** Desinfección superficial de tejidos de fréjol. Cornejo, 2014.

- De 2 a 5 fragmentos tisulares desinfectados y secos fueron ubicados en cajas Petri (60 mm) con APD (Anexo2).

- Incubación a temperatura y luz ambiental hasta observar desarrollo microbiano (2 a 5 días).
- Purificación de las colonias con características micóticas en cajas Petri (15 mm) con APD.
- Observación al microscopio de las colonias puras aisladas con un aumento de 40x, para verificar las características morfológicas fúngicas (Figura 5).



**Figura 5.** Presencia de conidios y micelio fúngico (*Alternaria* sp., 40x). Cornejo, 2014.

#### 3.7.3.2. Extracción de ADN (Promega-Corporation, 2010)

La extracción del ADN micótico se realizó mediante un kit comercial. El protocolo usado fue el reportado por el fabricante para extraer ADN vegetal con ligeras modificaciones, el mismo que se detalla a continuación:

- Recolectar suavemente el micelio, incubado por 7 días, con ayuda de un bisturí, cuidando de no tomar medio de cultivo.
- Colocar aproximadamente 40 mg de tejido fúngico en un microtubo de 1,5 mL y romper el tejido con la ayuda de un pistilo plástico.
- Agregar 600 µl de la *Nuclei Lysis Solution* (Solución de Lisis Nuclear) y mezclar en el vortex por 1 a 3 segundos.

- Incubar a 65°C por 15 minutos en un termobloque.
- Agregar 3 µl de la solución de enzima RNasa (ribonucleasa) y mezclar por inversión de 2 a 5 veces. Incubar los tubos a 37°C por 15 minutos, y dejarlos a temperatura ambiente por 5 minutos más.
- Agregar 200 µl de la solución de precipitación proteica y mezclar en el vortex vigorosamente por 20 segundos.
- Centrifugar por 3 minutos a  $13\,000\text{--}16\,000 \times g$ . El precipitado proteico formará un pellet.
- Cuidadosamente remover el sobrenadante con el ADN y transferirlo a un tubo de 1,5 ml conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- Vigorosamente mezclar la solución por inversión hasta observar la formación de una masa de hebras de ADN.
- Centrifugar por 1 minuto a  $13\,000\text{--}16\,000 \times g$ .
- Cuidadosamente decantar el sobrenadante. Agregar 600 µl de etanol al 70% temperado e invertir el tubo varias veces para lavar el ADN.
- Aspirar cuidadosamente el etanol usando una pipeta automática.
- Invertir el tubo en papel absorbente y dejar secar el pellet por 15 minutos.
- Agregar 100 µl de la Solución de Rehidratación de ADN y dejar rehidratar a 65°C por 1 hora. Periódicamente mezclar el tubo vigorosamente.
- Guardar el ADN entre 2 a 8°C.



### 3.7.3.3. Determinación de la Concentración y Pureza del ADN.

La concentración y pureza del material genético extraído se evaluó con espectrofotómetro mediante el siguiente proceso:

- Limpiar el lente del lector con una gota de agua ultra pura y secarlo con papel para microscopio.
- Realizar el blanqueamiento utilizando 1 µl la solución de rehidratación de ADN. Secar el lente.
- Colocar 1 µl de nuestra muestra y realizar la medición con un espectro de 260 nm.

### 3.7.3.4. Preparación del Master Mix para PCR.

En el presente estudio se utilizó la mezcla *GoTaq® Green Master Mix* y los cebadores (*primers*) *forward* ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) y *reverse* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Los volúmenes y concentraciones de los reactivos se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Volúmenes y reactivos utilizados para el Master Mix. Garzón, 2013 (comunicación personal).

| Reactivos            | Volumen por reacción (µl) |
|----------------------|---------------------------|
| Agua ultrapura       | 8,5                       |
| <i>GoTaq Mix</i> 1x  | 12,5                      |
| 10 µM-Cebador F ITS5 | 1,00                      |
| 10 µM-Cebador R ITS4 | 1,00                      |
| ADN <50 ng/ul        | 2,0                       |
| VolumenTotal         | 25,0                      |

### 3.7.3.5. Amplificación de la Región ITS

Para la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal fúngico, se utilizaron 2 protocolos con condiciones semejantes, donde únicamente varió la temperatura de hibridación y los tiempos de los ciclos. Este hecho se debió a que con las condiciones del protocolo N° 1 no se obtuvieron todas las amplificaciones esperadas y por ello se recurrió a un segundo protocolo.

Las condiciones del termociclador para la PCR se detallan en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Protocolo N°1 estandarizado para la amplificación de la región ITS del ADN de hongos en el proyecto I13119, PUCE. Cornejo, 2014.

| Protocolo N°1        |      |             |           |
|----------------------|------|-------------|-----------|
| Denaturación inicial | 95°C | 3 minutos   | 1 ciclo   |
| Denaturación         | 94°C | 30 segundos | 35 ciclos |
| Hibridación          | 57°C | 40 segundos |           |
| Elongación           | 72°C | 1 minuto    |           |
| Elongación final     | 72°C | 5 minutos   | 1 ciclo   |

**Tabla 4.** Protocolo estandarizado para amplificar la región ITS del ADN de hongos en el Laboratorio de fitopatógenos de la Rizósfera, OSU, USA. Garzón, 2013 (comunicación personal).

| Protocolo N°2        |      |             |           |
|----------------------|------|-------------|-----------|
| Denaturación inicial | 95°C | 10 minutos  | 1 ciclo   |
| Denaturación         | 94°C | 1 minuto    | 35 ciclos |
| Hibridación          | 50°C | 30 segundos |           |
| Elongación           | 72°C | 1 minuto    |           |
| Elongación final     | 72°C | 10 minutos  | 1 ciclo   |

### 3.7.3.6. Visualización de los Amplicones

Para la visualización de los productos de la PCR se realizó una corrida electroforética en una cámara horizontal por 50 minutos a 90 voltios en geles de agarosa a una concentración del 1%, teñidos con 3 µl de *DNA SYBR® Safe Gel stain*.

En todas las corridas se colocó en el carril N° 1,5 µl del *ladder* (escalera) de 100 pares de bases y un control negativo en el último carril, el cual consistió del *Master mix* sin ADN. Se colocó 3 µl del amplicón a ser visualizado por pocillo.

Posterior a la electroforesis, se realizó la visualización de los productos de PCR utilizando un transiluminador UV.

#### 3.7.3.7. Secuenciación de los Amplicones

Todos los amplicones visualizados por electroforesis fueron enviados a Macrogen Inc. en Corea del Sur, para su purificación y secuenciación de ambas cadenas de ADN (*Forward* y *Reverse*).

Una semana después se recibió en forma digital las secuencias correspondientes a las regiones ITS1-5.8-ITS2 de cada muestra.

### 3.3.4. Análisis de Secuencias

Cada una de las secuencias obtenidas, tanto *forward* (ITS5) como *reverse* (ITS4) de los aislados fúngicos, fueron editadas manualmente mediante el programa bioinformático Bioedit 7.1 (Hall, 1999).

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron alineadas (previa obtención del reverso complementario de la secuencia ITS4) y se procedió al análisis de sus respectivos espectrogramas hasta obtener un consenso entre ambas secuencias.

Posteriormente, se comparó las secuencias consensos del estudio con las secuencias disponibles en el Banco de Genes del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

### 3.3.5. Índices de Diversidad

La diversidad de los hongos endófitos se evaluó usando el software BioDiversity Pro versión 2 (McAleece et al., 1997), mediante el cual se calcularon los siguientes índices: **Índice de Shannon** ( $H' = -\sum p_i \ln p_i$ ) donde  $p_i$  es la proporción de cada OTU (Unidad Taxonómica Operacional) en el número total de individuos en la comunidad y el **Índice de Simpson** ( $D = \sum n_i (n_i - 1) / N (N - 1)$ ) donde  $n_i$  es el número de individuos en un OTU y  $N$  es el número total de individuos en la comunidad. El Índice de Shannon mide la diversidad de los endófitos, mientras que Simpson mide la dominancia de estos en la población (Marcial et al., 2012).

**La riqueza** ( $S$ ) corresponde al número de OTUs encontradas en la comunidad en estudio (Marcial et al., 2012).

Las especies identificadas fueron tomadas como nuestras OTUs.

### 3.3.6. Construcción del Árbol Filogenético

Para conocer la filogenia de los hongos aislados se construyó un árbol filogenético mediante el programa bioinformático Mega 6 (Tamura, Stecher, Peterson, & Kumar, 2013), previa alineación de las secuencias de interés. Dicho dendograma fue elaborado utilizando el método de *Neighbor-Joining*, que agrupa las secuencias más relacionadas, obteniendo así un árbol muy robusto (Saitou & Nei, 1987). El método estadístico empleado fue *Bootstrap* con 1000 repeticiones. Como grupo externo se utilizó la secuencia del NCBI con número de acceso AY349108, correspondiente a *Blastocladiella emersonii*, un hongo acuático perteneciente al filo *Chytridiomycota* (*Blastocladiomycota*).

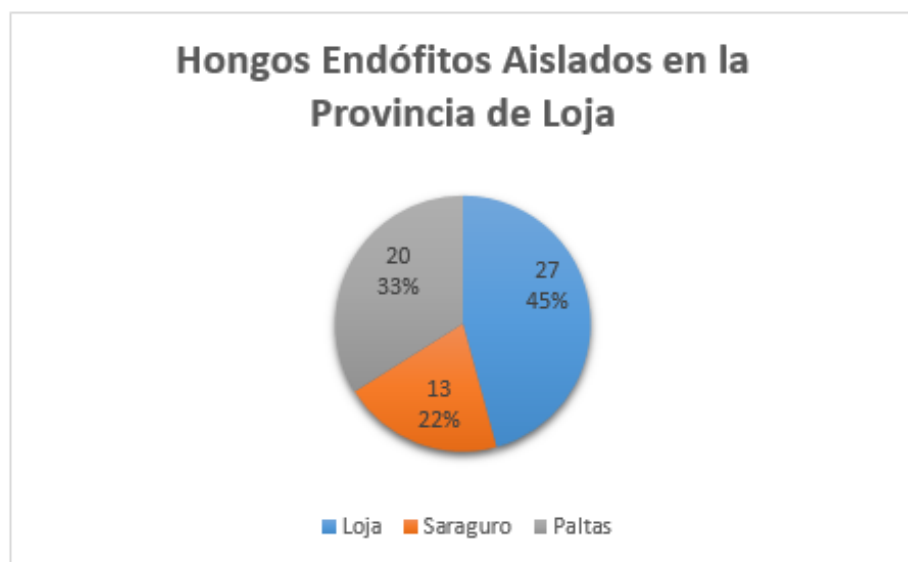
## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento de Hongos Endófitos de Hojas, Vainas y Tallos.

De las 100 muestras de fréjol recolectadas se lograron aislar 60 hongos endófitos. Este número de aislados corresponde a los hongos que no resultaron contaminados con ácaros. Estos organismos provocaron contaminación cruzada en algunos aislados y por lo tanto no se los tomó en cuenta para el estudio.

De los 60 hongos endófitos aislados en la provincia de Loja, 20 pertenecen al cantón Paltas (19 en hojas y 1 en tallo), 13 aislados al cantón Saraguro (12 de hojas y 1 de vaina) y 27 al cantón Loja (16 en vainas y 11 en hojas) (Figura 6).



**Figura 6.** Hongos endófitos aislados de 3 cantones en la provincia de Loja. Cornejo, 2014.

## 4.2. Concentración y Pureza de ADN

La concentración del ADN de los hongos endófitos varió desde 1 a 68,1 ng/μl. Mientras que los rangos de pureza oscilaron entre 0,81 y 3,42 (Tabla 5).

Concentraciones por debajo de 50 ng/μl fueron utilizadas directamente para su amplificación, mientras que, concentraciones superiores fueron diluidas utilizando agua libre de nucleasas, con el fin de alcanzar la concentración deseada. Rangos óptimos de pureza entre 1,8 y 2 eran los esperados, pese a que no todas las muestras obtuvieron estos niveles, no existió complicación alguna al realizar la reacción en cadena de la polimerasa.

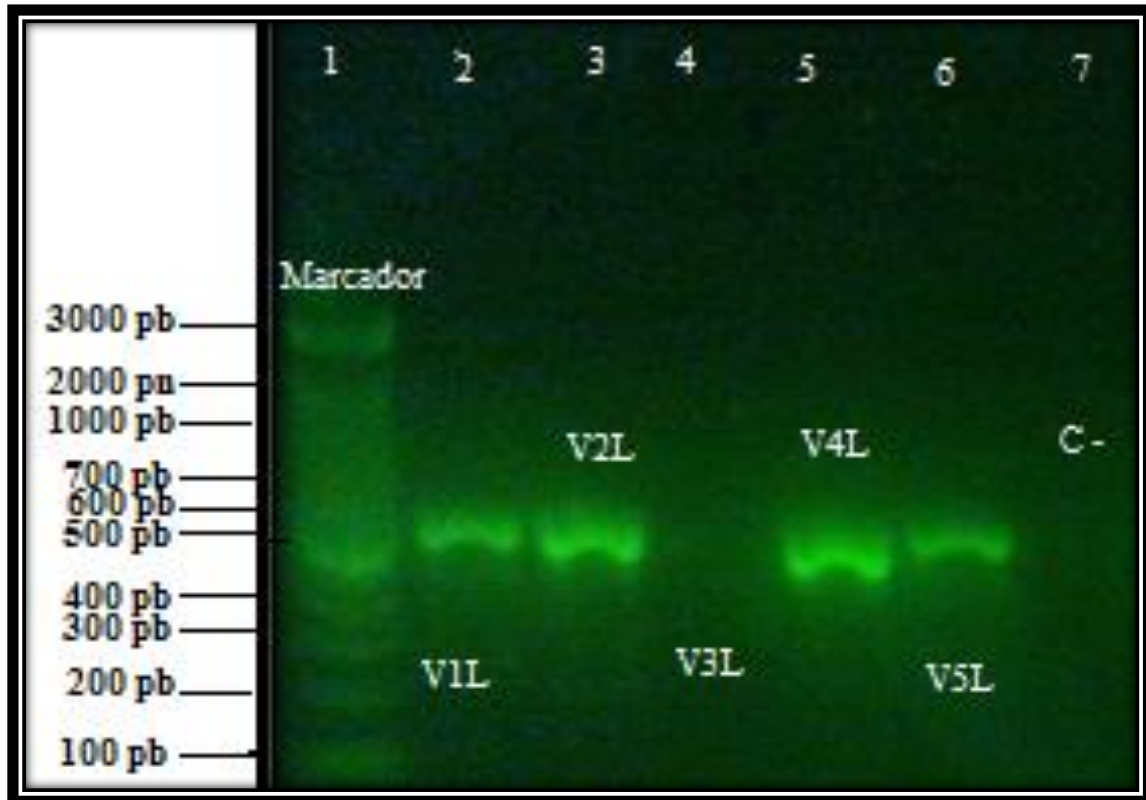
**Tabla 5.** Medidas de la concentración y pureza del ADN. Cornejo, 2013.

| <b>Código</b> | <b>Concentración ADN (ng/μl)</b> | <b>Pureza 260/280</b> |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1HS           | 28,6                             | 1,80                  |
| 2HS           | 33,7                             | 2,10                  |
| 3HL           | 12,2                             | 1,89                  |
| 4HS           | 11,5                             | 1,45                  |
| 5HS           | 3                                | 1,73                  |
| 7HL           | 46,8                             | 1,91                  |
| 8HL           | 23                               | 1,86                  |
| 9HS           | 25,3                             | 1,60                  |
| 10HS          | 18                               | 1,48                  |
| 11HL          | 16,3                             | 1,62                  |
| 12HL          | 17,5                             | 1,74                  |
| 13HL          | 27,4                             | 1,42                  |
| 14HS          | 40,2                             | 1,82                  |
| 15HL          | 11,3                             | 1,64                  |
| 16HP          | 36,3                             | 1,59                  |
| 17HL          | 42,4                             | 1,64                  |
| 18HS          | 1                                | 0,83                  |
| 19HS          | 6,5                              | 1,69                  |
| 20HP          | 7                                | 1,74                  |
| 21HL          | 18,7                             | 1,62                  |
| 22HS          | 8,2                              | 2,12                  |
| 23HP          | 7,2                              | 1,62                  |

|      |      |      |
|------|------|------|
| 24HL | 30,1 | 1,46 |
| 25HP | 28,4 | 1,81 |
| 26HL | 19   | 1,83 |
| 27HP | 34,8 | 1,72 |
| 28HS | 45,6 | 1,92 |
| 29HS | 40   | 1,22 |
| 30HP | 29,3 | 1,47 |
| 31HP | 36,7 | 1,47 |
| 32HP | 36,4 | 1,66 |
| 33HP | 6,4  | 2,04 |
| 34HP | 1,8  | 2,28 |
| 35HP | 2    | 1,75 |
| 36HP | 5    | 2,16 |
| 37HP | 32   | 1,81 |
| 38HP | 15   | 1,45 |
| 39HP | 8    | 1,73 |
| 40HP | 36,7 | 1,91 |
| 41HP | 28   | 1,86 |
| 42HP | 40   | 1,60 |
| 43HP | 1,8  | 1,82 |
| V1L  | 42,4 | 1,21 |
| V2L  | 12   | 1,67 |
| V3L  | 10   | 1,10 |
| V4L  | 1,8  | 3,44 |
| V5L  | 50   | 0,81 |
| V6L  | 20   | 1,86 |
| V7L  | 26,2 | 3,21 |
| V9L  | 68,1 | 2,15 |
| V10L | 32,8 | 2,13 |
| V11L | 15,9 | 3,42 |
| V12L | 39,2 | 1,11 |
| V13L | 11   | 1,74 |
| V14L | 9,5  | 1,89 |
| V15L | 16,2 | 1,58 |
| V16L | 37,1 | 1,92 |
| V18L | 30   | 2,18 |
| V19S | 35,8 | 1,53 |
| T1P  | 8,2  | 1,87 |

### 4.3. Amplicones de las secuencias ITS

Como resultado de la amplificación de la región ITS, el tamaño de los amplicones fue el esperado, entre 500 a 600 pares de bases (Figura 7).



**Figura 7.** Visualización de los amplicones de la región ITS. Cornejo, 2014.

Podemos observar en la figura 7, en el primer carril al marcador de 100pb, seguido por la banda de la muestra V1L, en el tercer carril se encuentra V2L, en el cuarto carril no hay presencia de producto de PCR correspondiente a la muestra V3L, en el quinto y sexto carril observamos los amplicones de las muestras V4L y V5L respectivamente. En el último carril se encuentra el control negativo. Las muestras que no fueron amplificadas utilizando el protocolo N°1, como por ejemplo V3L, fueron amplificadas exitosamente mediante el protocolo N° 2.



#### 4.4. Identificación Molecular de Hongos Endófitos en *Phaseolus vulgaris* L.

El análisis de las secuencias de las regiones ITS permitieron identificar 28 especies distintas de hongos endófitos aislados de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. en la provincia de Loja.

En el cantón Loja se logró identificar en total 14 especies de endófitos (Tabla 6), el cantón Saraguro mostró 9 especies (Tabla 7) y en el cantón Paltas se identificaron 11 especies de hongos (Tabla 8).

**Tabla 6.** Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en vainas (VL) y hojas (HL) de *Phaseolus vulgaris* L. pertenecientes al cantón Loja. Cornejo, 2014

| Código del aislado | Parte de la planta | Cobertura | Valor E | Porcentaje de identidad | Identificación                 | No. GenBank |
|--------------------|--------------------|-----------|---------|-------------------------|--------------------------------|-------------|
| V1L                | Vaina              | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Didymella</i> sp.           | HM068373.1  |
| V2L                | Vaina              | 98%       | 0.0     | 100%                    | <i>Alternaria alternata</i>    | HQ846574.1  |
| V3L                | Vaina              | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium</i> sp. (1)        | JN207334.1  |
| V4L                | Vaina              | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Fusarium</i> sp. (2)        | KF181246.1  |
| V5L                | Vaina              | 97%       | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium</i> sp. (1)        | JN207334.1  |
| V6L                | Vaina              | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Fusarium incarnatum</i>     | KC989098.1  |
| V7L                | Vaina              | 99%       | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium</i> sp. (1)        | JN207334.1  |
| V9L                | Vaina              | 98%       | 0.0     | 98%                     | <i>Gibberella moniliformis</i> | GQ168842.1  |
| V10L               | Vaina              | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Fusarium oxysporum</i>      | KF181241.1  |
| V11L               | Vaina              | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium</i> sp. (2)        | KF181246.1  |
| V12L               | Vaina              | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Fusarium</i> sp. (3)        | HQ832805.1  |
| V13L               | Vaina              | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Rhizoctonia solani</i>      | KF746162.1  |
| V14L               | Vaina              | 96%       | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium equiseti</i>       | JN038469.1  |
| V15L               | Vaina              | 99%       | 0.0     | 100%                    | <i>Alternaria citrimaculis</i> | HG798724.1  |
| V16L               | Vaina              | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium incarnatum</i>     | KC989098.1  |
| V18L               | Vaina              | 99%       | 0.0     | 99%                     | <i>Fusarium equiseti</i>       | JN038469.1  |
| 3HL                | Hoja               | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Phoma exigua</i>            | EU343168.1  |
| 7HL                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Epicoccum nigrum</i>        | EU272494.1  |
| 8HL                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Phoma macrostoma</i>        | AF046020.2  |
| 11HL               | Hoja               | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>       | KF251145.1  |
| 12HL               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>       | KF251145.1  |

|      |      |      |     |      |                              |            |
|------|------|------|-----|------|------------------------------|------------|
| 13HL | Hoja | 100% | 0.0 | 100% | <i>Boeremia telephii</i>     | KF251145.1 |
| 15HL | Hoja | 74%  | 0.0 | 98%  | <i>Phoma exigua</i>          | GU062320.1 |
| 17HL | Hoja | 100% | 0.0 | 99%  | <i>Phoma macrostoma</i>      | DQ474109.1 |
| 21HL | Hoja | 100% | 0.0 | 99%  | <i>Epicoccum nigrum</i>      | FJ424255.1 |
| 24HL | Hoja | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i> | KJ082100.1 |
| 26HL | Hoja | 100% | 0.0 | 99%  | <i>Boeremia telephii</i>     | KF251145.1 |

**Tabla 7.** Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en hojas (HS) y vaina (VS) de *Phaseolus vulgaris* L. pertenecientes al cantón Saraguro. Cornejo, 2014

| Código del aislado | Parte de la planta | Cobertura | Valor E | Porcentaje de identidad | Identificación                          | No. GenBank |
|--------------------|--------------------|-----------|---------|-------------------------|---|-------------|
| 1HS                | Hoja               | 97%       | 0.0     | 99%                     | <i>Phoma tropica</i>                    | JF923820.1  |
| 2HS                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>                | KF251145.1  |
| 4HS                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Alternaria alternata</i>             | KF998553.1  |
| 5HS                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Trichothecium roseum</i>             | JQ434579.1  |
| 9HS                | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>                | KF251145.1  |
| 10HS               | Hoja               | 99%       | 0.0     | 99%                     | <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> | EU167573.1  |
| 14HS               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Fusarium culmorum</i>                | KF646093.1  |
| 18HS               | Hoja               | 99%       | 0.0     | 99%                     | <i>Alternaria</i> sp.                   | KC139493.1  |
| 19HS               | Hoja               | 96%       | 0.0     | 98%                     | <i>Epicoccum nigrum</i>                 | JF440590.1  |
| 22HS               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>                | KF251145.1  |
| 28HS               | Hoja               | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Epicoccum nigrum</i>                 | JQ619839.1  |
| 29HS               | Hoja               | 99%       | 0.0     | 99%                     | <i>Phoma</i> sp.                        | JN578636.1  |
| V19S               | Vaina              | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>                | KF251145.1  |

**Tabla 8.** Identificación molecular basados en la región ITS de hongos endófitos aislados en hojas (HP) y tallo (TP) en *Phaseolus vulgaris* L. pertenecientes al cantón Paltas. Cornejo, 2014.

| Código del aislado | Parte de la planta | Cobertura | Valor E | Porcentaje de identidad | Identificación               | No. GenBank |
|--------------------|--------------------|-----------|---------|-------------------------|------------------------------|-------------|
| 16HP               | Hoja               | 96%       | 0.0     | 98%                     | <i>Bionectria</i> sp.        | KF746136.1  |
| 20HP               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Alternaria tenuissima</i> | KJ082100.1  |
| 23HP               | Hoja               | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Periconia byssoides</i>   | KC954160.1  |
| 25HP               | Hoja               | 98%       | 0.0     | 99%                     | <i>Boeremia telephii</i>     | KF251145.1  |
| 27HP               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 99%                     | <i>Alternaria tenuissima</i> | KJ082100.1  |
| 30HP               | Hoja               | 100%      | 0.0     | 100%                    | <i>Alternaria tenuissima</i> | KJ082100.1  |

|      |       |      |     |      |                                     |            |
|------|-------|------|-----|------|-------------------------------------|------------|
| 31HP | Hoja  | 97%  | 0.0 | 99%  | <i>Fusarium subglutinans</i>        | KC464632.1 |
| 32HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i>        | KJ082100.1 |
| 33HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i>        | KJ082100.1 |
| 34HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i>        | KJ082100.1 |
| 35HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria brassicicola</i>      | KJ174435.1 |
| 36HP | Hoja  | 98%  | 0.0 | 99%  | <i>Alternaria brassicicola</i>      | KF542552.1 |
| 37HP | Hoja  | 97%  | 0.0 | 99%  | <i>Cladosporium tenuissimum</i>     | GU248330.1 |
| 38HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria brassicicola</i>      | KF542552.1 |
| 39HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 99%  | <i>Phoma moricola</i>               | GQ352491.1 |
| 40HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i>        | KJ082100.1 |
| 41HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 99%  | <i>Epicoccum nigrum</i>             | FJ424247.1 |
| 42HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Cladosporium perangustum</i>     | HM148148.1 |
| 43HP | Hoja  | 100% | 0.0 | 100% | <i>Alternaria tenuissima</i>        | KJ082100.1 |
| T1P  | Tallo | 100% | 0.0 | 100% | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | KF841560.1 |

Todos los aislados son parte del grupo de hongos endófitos no clavicipitaceos clase 2 y 3, ya que presentaron características de ambos grupos, como por ejemplo, la colonización de los tejidos de los brotes de la planta (clase 2 y 3), una colonización extensa (clase 2) y la alta biodiversidad de especies distintas (clase 3) (Rodríguez et al., 2009).

La gran cantidad y diversidad de especies de endófitos pertenecientes al filo *Ascomycota*, así como el bajo número de organismos *Basidiomycotas* encontrados en el estudio concuerda con varias investigaciones concernientes a hongos endófitos, donde se han obtenido resultados semejantes (Petrini, 1991; Arnold, 2002; Herre et al., 2005; Arnold & Lutzoni, 2007; Arnold, 2007; Rodríguez et al., 2009; Sim, Khoo, Lee, & Cheah, 2010; Douanla & Langer, 2012; Vieira et al., 2012).

Los géneros aislados, *Alternaria*, *Fusarium*, *Boeremia*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Trichothecium*, *Stagonosporopsis*, *Bionectria*, *Periconia*, *Didymella*, *Gibberella* y *Rhizoctonia*, han sido previamente catalogados como fitopatógenos y descomponedores por varios investigadores (Arenal, Platas, Monte, & Pelaéz, 2000; Sandoval, Ofelia, & Bonilla, 2003; Arenal, Platas, & Peláez, 2004; Morales & Rodríguez, 2006; Hirooka & Kobayashi, 2007; Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley, & Crous, 2010; Snowdon, 2010; Rosa et al., 2012;

de Gruyter et al., 2012; Blancard, 2014; Markovskaja & Kacergius, 2014); pero también muchos otros estudios los han aislados como endófitos (Freeman & Morrison, 1949; Fishery & Petrini, 1992; Brownl, Hyde, & Guese, 1998; Otero, Ackerman, & Bayman, 2002; Seena & Sridhar, 2004; Salgado & Cepero, 2005; Anita & Sridhar, 2009; Aveskamp et al., 2010; Rosa et al., 2012). Este interesante hecho se debe a que existe una estrecha relación taxonómica entre los distintos tipos de hongos (fitopatógenos, saprofitos y endófitos) (Carroll, 1988; Petrini, 1991; Salgado & Cepero, 2005). Efectivamente se ha comprobado que los hongos endófitos cambian su estrategia ecológica para así vivir de una manera saprofítica cuando su huésped entra en estado de senescencia (Promputtha et al., 2007). Al igual que este hecho, factores ambientales juegan un rol significativo en el comportamiento del hongo, es decir al existir un desbalance en la relación hongo-planta se da lugar a un cambio en la relación que no siempre es benéfico para ambos (Schulz, Rommert, Dammann, Aust, & Starck, 1999; Morales & Rodríguez, 2006).

Un estudio llevado a cabo en Colombia, con el objetivo de identificar molecularmente a hongos aislados de tejidos de fréjol con síntomas de antracnosis, obtuvo entre los aislados a distintos hongos endófitos, entre ellos *Gibberella*, *Phoma*, *Alternaria* y *Fusarium* (Vanegas et al., 2014), lo cual coincide con lo hallado en el presente estudio, donde los géneros *Phoma* (syn. *Boeremia*), *Alternaria* y *Fusarium* fueron los más abundantes dentro de los endófitos estudiados. De igual manera, otros estudios en leguminosas han encontrado como principales endófitos a hongos tales como *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum nigrum*, *Glomerella cingulate*, *G. glycines*, *Nigrospora sphaerica*, *Colletotrichum truncatum*, *Chaetomium globosum*, *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Drechslera* sp., *Penicillium* sp., *Phomopsis longicolla*, *P. sojae*, *Phomopsis* sp., *Pleospora herbarum*, *Fusarium* spp. y *Stemphylium* sp. (Urrutia, Angeles, Alippi, Rollán, & Larran, 2002; Seena & Sridhar, 2004; Dudeja, Giri, Saini, Suneja, & Kothe, 2012), lo cual demuestra una vez más que tales organismos (catalogados en el pasado como fitopatógenos) cumplen un papel endófito en las plantas.

Entre los hongos endófitos aislados en el presente estudio tenemos especímenes con un antecedente biotecnológico muy prometedor, tal es el caso de *Periconia byssoides*, un hongo productor de metabolitos antitumorales (Yamada et al., 2007). De igual forma *Fusarium*

*incarnatum* produce alcaloides citotóxicos que cumplen el mismo fin antitumoral (Ding, Dahse, & Hertweck, 2012).

Por otra parte, el endófito *Phoma exigua* es capaz de generar un compuesto químico conocido como citocalasina B, sustancia de la cual se derivan varios compuestos con distinta actividad biológica, como por ejemplo efectos citotóxicos (Bottalico, Capasso, Evidente, & Vurro, 1994). La eliminación de malas hierbas es uno más de los atributos dentro del género *Phoma*. Por ejemplo, *P. macrostoma* es un herbicida natural (Bailey, Falk, & Lombardo, 2009). Además de estas propiedades, a este género se le atribuye varias características significativas para las plantas como la promoción del crecimiento, debido a la síntesis de giberelinas (Hamayun et al., 2010).

*Epicoccum nigrum* y *Trichothecium roseum* tienen la capacidad de actuar como controladores biológicos de hongos fitopatógenos gracias a su capacidad antagónica de producir sustancias antifúngicas que limitan el desarrollo de los patógenos (Kortekamp, 1997; Zhang et al., 2010).

Entre los hongos productores de sustancias antibióticas tenemos también a *Fusarium equiseti* (Burmeister, Bennett, Vesonder, & Hesseltine, 1974) y *Phoma moricola* (Vieira et al., 2012).

El hongo endófito *Alternaria tenuissima*, una de las especies más abundantes encontradas en *Phaseolus vulgaris* L. es el responsable de producir elicitores de glicoproteínas que actúan como inductores en la resistencia vegetal contra enfermedades (Yang, Qiu, Zeng, Yuan, & Mao, 2009), así también se ha visto que sustancias antifúngicas son producidas por este (Chagas, Dias, & Pupo, 2013).

El único aislado de *Bionectria* sp. podría presentar beneficios tales como los de *B. ochroleuca*, un entomopatógeno de áfidos (Guesmi, Garrido, López, Halima, & Quesada, 2014) y productor de antibióticos (Vasudeva, Ravishankar, & Lokanatha, 2014).

La producción de antifúngicos, antibióticos, antitumorales, giberelinas, elicitores y un comportamiento entomopatógeno por parte de los endófitos, sugiere protección simbiótica con grandes beneficios para su planta huésped (Rosa et al., 2012). De esta manera podemos presumir

que la relación que tienen estos hongos con las lesiones necróticas en el fréjol común es benéfica, actuando así como antagonistas de fitopatógenos y mejorando las defensas vegetales.

#### 4.5. **Diversidad de Hongos Endófitos en *Phaseolus vulgaris* L.**

La tabla 9 nos indica la riqueza de los cantones Loja, Saraguro y Paltas. Podemos observar también que las especies *Epicoccum nigrum* y *Boeremia telephii* están presentes en los tres cantones, de igual manera vemos que *Alternaria alternata* fue encontrada en el Loja y Saraguro y que *A. tenuissima* estuvo tanto en Loja como en Paltas, lo cual nos indica la dominancia de estos hongos endófitos entre los cantones de la provincia de Loja.

El Índice de Shannon ( $H'$ ) y de Simpson ( $D$ ) de la provincia de Loja fue de 1,28 y 0,06, respectivamente. Al comparar los índices de  $H'$  entre los cantones Loja, Saraguro y Paltas se encontro el valor más alto de  $H'$  en el cantón Loja (Figura 8).

Al comparar los Índices de  $D$  y  $H'$  vemos una consistencia entre ambos, por ejemplo el valor máximo de  $D$  (Paltas) coincide con el valor mínimo de  $H'$  (Paltas) y todos los valores de  $D$  se relacionan inversamente con de  $H'$  (Figuras 8 y 9). Estos valores nos indican una diversidad en equilibrio de hongos endófitos pertenecientes al fréjol común en la provincia de Loja.

**Tabla 9.** Número de hongos endófitos identificados en tres cantones de la provincia de Loja y cuantificación de especies. Cornejo, 2014

| <b>Especies</b>                         | <b>Cantones</b> |                 |               |
|---|-----------------|-----------------|---------------|
|   | <b>Loja</b>     | <b>Saraguro</b> | <b>Paltas</b> |
| <i>Didymella</i> sp.                    | 1               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Alternaria alternata</i>             | 1               | 1               | n.p.          |
| <i>Fusarium</i> sp.                     | 6               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Fusarium incarnatum</i>              | 2               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Gibberella moniliformis</i>          | 1               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Fusarium oxysporum</i>               | 1               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Rhizoctonia solani</i>               | 1               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Fusarium equiseti</i>                | 2               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Alternaria citrimaculatis</i>        | 1               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Phoma exigua</i>                     | 2               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Epicoccum nigrum</i>                 | 2               | 2               | 1             |
| <i>Phoma macrostoma</i>                 | 2               | n.p.            | n.p.          |
| <i>Boeremia telephii</i>                | 4               | 4               | 1             |
| <i>Alternaria tenuissima</i>            | 1               | n.p.            | 8             |
| <i>Phoma tropica</i>                    | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Trichothecium roseum</i>             | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Fusarium culmorum</i>                | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Alternaria</i> sp.                   | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Phoma</i> sp.                        | n.p.            | 1               | n.p.          |
| <i>Bionectria</i> sp.                   | n.p.            | n.p.            | 1             |
| <i>Periconia byssoides</i>              | n.p.            | n.p.            | 1             |
| <i>Cladosporium perangustum</i>         | n.p.            | n.p.            | 1             |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>     | n.p.            | n.p.            | 1             |
| <i>Cladosporium tenuissimum</i>         | n.p.            | n.p.            | 1             |
| <i>Fusarium subglutinans</i>            | n.p.            | n.p.            | 1             |

|                                |      |      |    |
|--------------------------------|------|------|----|
| <i>Alternaria brassicicola</i> | n.p. | n.p. | 3  |
| <i>Phoma moricola</i>          | n.p. | n.p. | 1  |
| <b>Riqueza S:</b>              | 14   | 9    | 11 |

El valor numérico corresponde al número de aislados de especie.

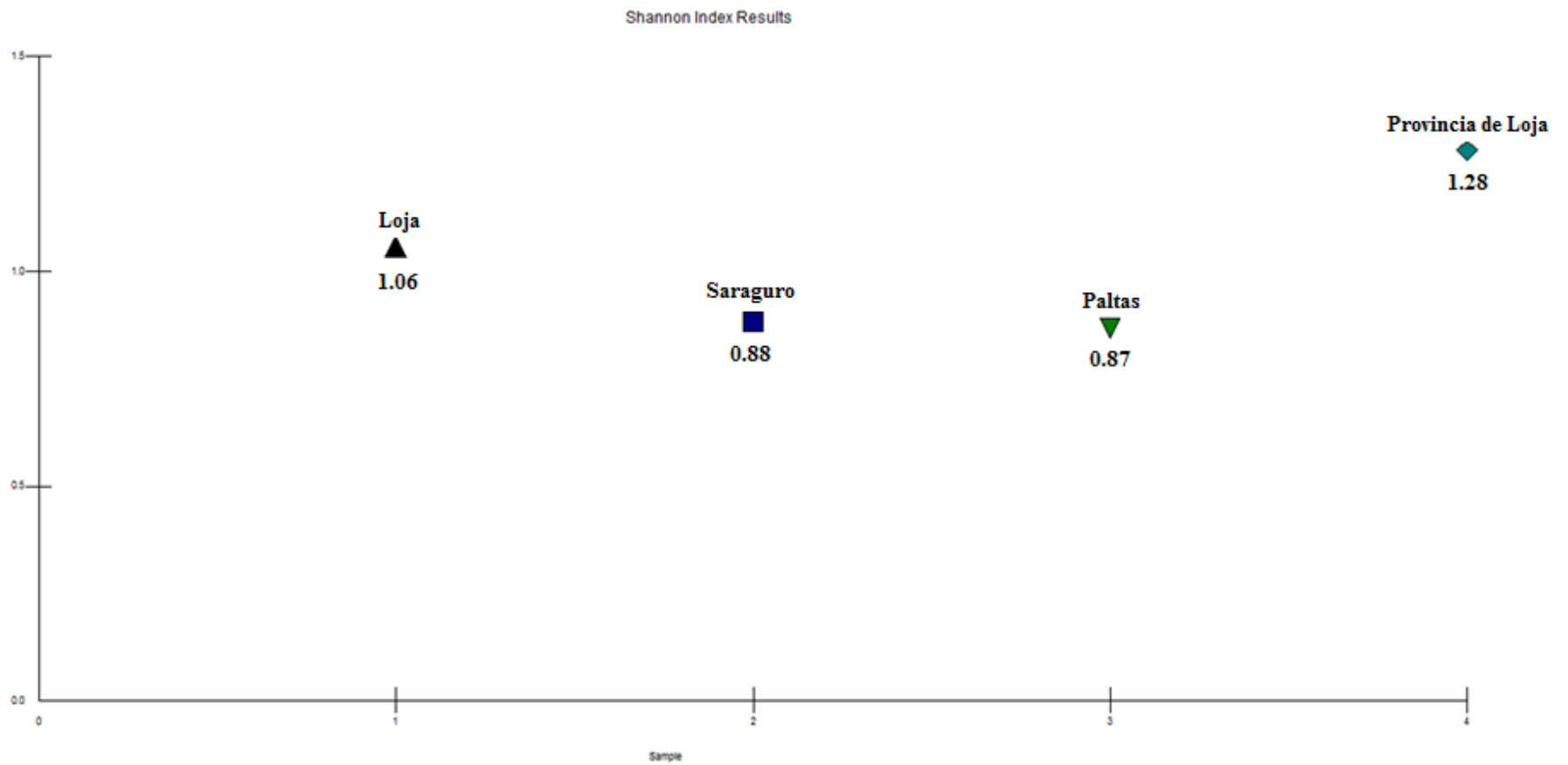
n.p.: No presente.

El Índice de Shannon nos muestra la heterogeneidad de hongos endófitos existentes en el fréjol común en la provincia de Loja. El valor de  $H'$  entre los cantones fue entre 0,87 y 1,06, mientras que el valor total de la provincia de Loja fue alto (1,28) comparándolo con los cantones (Figura 8), lo que demuestra gran diversidad de hongos en la planta. Sin embargo, al compararlo con otros estudios, tales como Anita y Sridhar (2009) que obtuvieron valores de 2,18, Seená y Sridhar (2004) 2,52 o con Rosa et al. (2012) que su índice fue de 2,4; los valores del presente estudio fueron bajos, esto pudo deberse a la cantidad de plantas estudiadas así como también al menor número y variedad de tejidos examinados (hoja, tallo y vaina vs hoja, tallo, vaina, semilla y raíz) y a las condiciones ambientales.

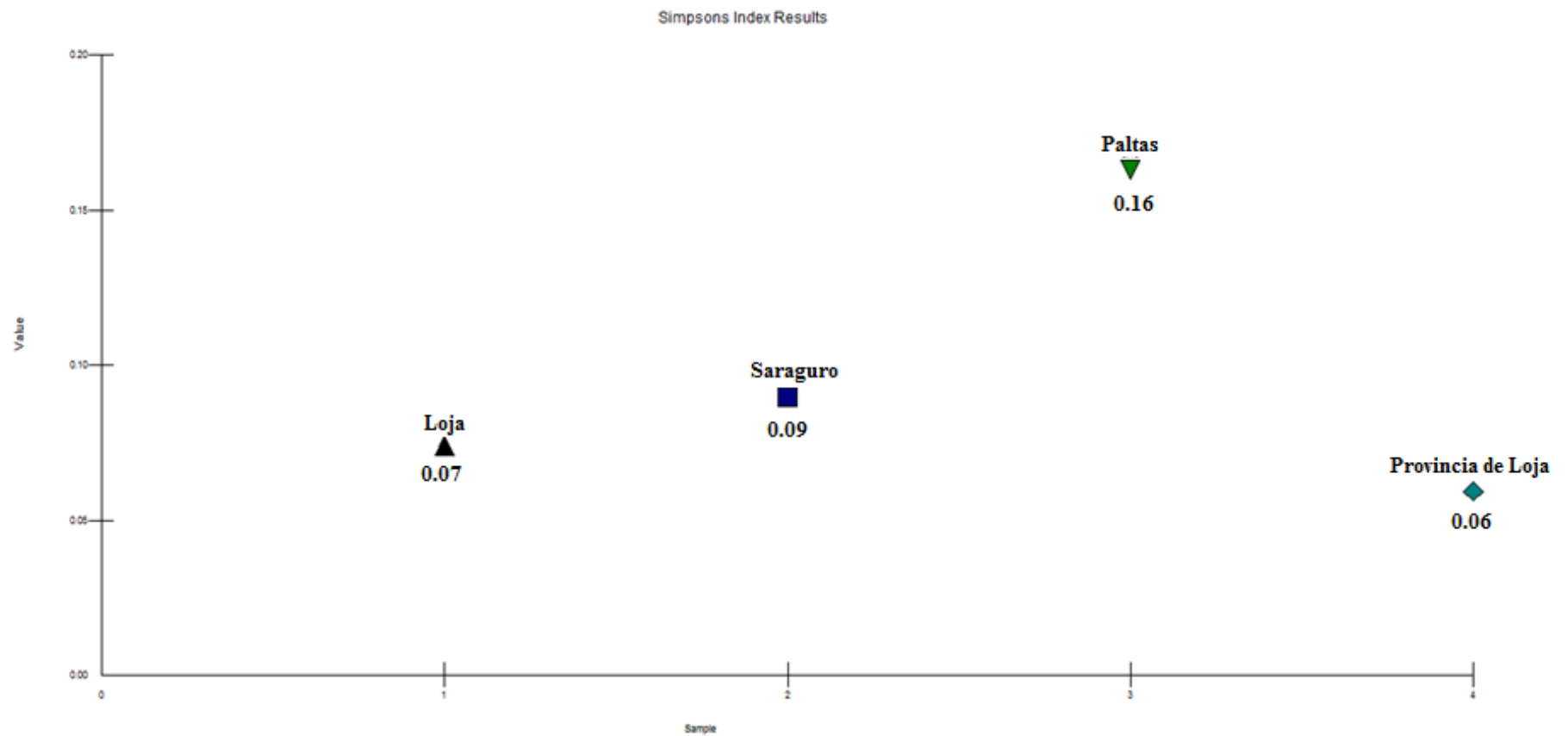
El cantón Loja que presentó en relación con los otros dos cantones, el valor más alto del Índice de Shannon, también mostro ser el más rico ( $S$ ) con un total de 14 especies (Tabla 9). Una posible razón para este hecho es que en esta zona la recolección de muestras fue mayor, comparada por ejemplo con Saraguro donde su  $S$  fue de 9 especies y su número de muestras la menor. A pesar de ello, este último cantón fue el segundo más diverso (Figura 8).

El Índice de Simpson nos indica la dominancia entre especies y se lo interpreta como la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie (Marcial et al., 2012). La alta dominancia de ciertas especies, como por ejemplo en Paltas, produce una influencia en el bajo valor de  $H'$ , lo cual se reflejó en el estudio, donde dicho cantón presentó la más baja heterogeneidad y a su vez el valor de  $D$  más alto (Figura 9). La especie que provocó dicho resultado fue *Alternaria tenuissima*, debido a que este hongo en comparación al resto fue el que se presentó en mayor cantidad (Tabla 9).





**Figura 8.** Índice de Shannon ( $H'$ ) de los cantones Loja, Saraguro, Paltas y el Índice total de la provincia de Loja. Cornejo, 2014



**Figura 9.** Índice de Simpson ( $D$ ) de los cantones Loja, Saraguro, Paltas y el Índice total de la provincia de Loja. Cornejo, 2014

En general, los géneros de hongos endófitos más abundantes en *P. vulgaris* L. fueron, *Boeremia* (syn. *Phoma*) y *Alternaria* con 16 individuos cada uno, seguido por *Fusarium* (13) y *Epicoccum* (5). Dentro de estos, las especies predominantes fueron *Boeremia telephii* y *Alternaria tenuissima* con igual número de aislados (9) seguidos por *Fusarium* sp. (6) y *Epicoccum nigrum* con 5 aislados. Los resultados obtenidos nos indican la dominancia de estos endófitos en la planta y por ende su posible especificidad hacia la misma (Gamboa, 2006). Así mismo, en otras leguminosas tales como *Glycine max*, *Canavalia cathartica* y *C. marítima*, estas especies se encuentran entre los principales endófitos aislados (Urrutia et al., 2002; Seená & Sridhar, 2004; Dudeja et al., 2012).

Esta investigación abre las puertas y pone en conocimiento los hongos endófitos relacionados a lesiones necróticas en el fréjol común, sirviendo como base para futuros estudios que permitan evaluar el rol que cumplen estos microorganismos en su planta huésped, así como sus beneficios biotecnológicos.

#### 4.6. Análisis Filogenético de los Endófitos Fúngicos.

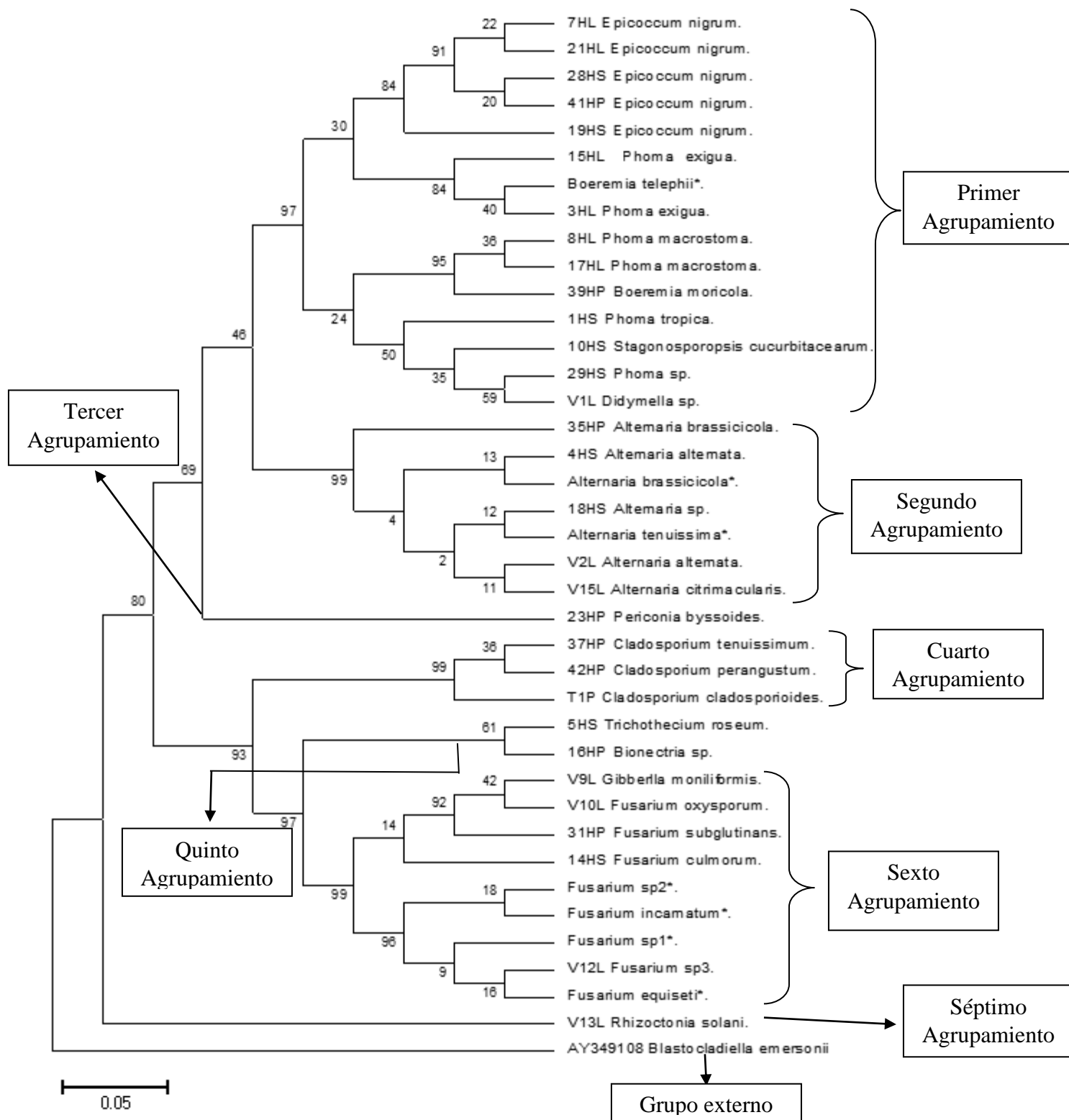
El árbol filogenético correspondiente a los hongos endófitos aislados del fréjol (Figura 10), muestra ocho grupos, en donde los seis primeros pertenecen al filo *Ascomycota* y los dos últimos a los filos *Basidiomycota* y *Blastocladiomycota* (*Chytridiomycota*). Los números que se encuentran en las ramas corresponden al porcentaje de soporte del valor de *Bootstrap*.

El primer agrupamiento con un 97% de soporte estadístico está conformado por cinco géneros, entre ellos *Boeremia*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Didymella* y *Stagonosporopsis*, todos miembros del filo *Ascomycota*. Lo atractivo en este *cluster* es la gran variedad de géneros y especies que lo conforman. Al revisar varios estudios observamos que todos estos hongos están íntimamente relacionados y por ello la explicación a este hecho. Así por ejemplo, vemos que *Didymella* es el telomorfo (estado reproductivo sexual) de *Phoma* y *Boeremia* (Aveskamp et al., 2010; Blancard, 2014). Y que *Boeremia* es el sinónimo de *Phoma* (Mycobank, 2014). Por otra parte, el

*Mycobank* (2014) (base de datos que documenta novedades en nomenclatura de hongos a nivel mundial) toma a *Boeremia* como nombre actual en lugar de *Phoma*.

Se ha visto también que *Stagonosporopsis* está estrechamente relacionado a géneros como *Phoma* y *Boeremia* (de Gruyter et al., 2012). Mientras que varios estudios indican que *Epicoccum* presenta gran relación filogenética con *Phoma* (Aveskamp et al., 2010), por lo que se ha planteado la sinonimia de ambos géneros (Arenal et al., 2000; Arenal et al., 2004). A pesar de este significativo hecho, en nuestro dendograma claramente podemos observar que *Epicoccum* está ramificado en otro grupo conformado únicamente por individuos pertenecientes a este género, por lo que se delimita cierta diferencia con *Boeremia*. De igual manera al observar al microscopio a ambos géneros (*Boeremia* y *Epicoccum*) podemos diferenciarlos sin dificultad alguna (Figura 11).

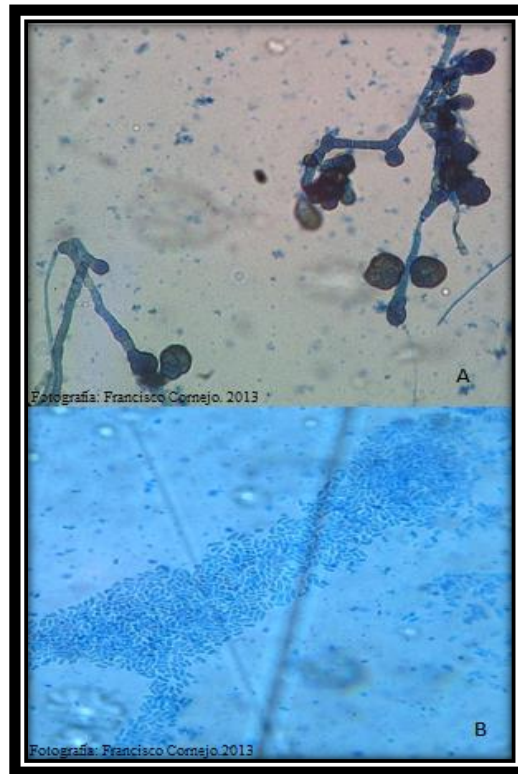
En el segundo grupo vemos a todas las especies del género *Alternaria*, con un soporte del 99%. En el tercer grupo encontramos únicamente a *Periconia byssoides*. Mientras que el cuarto agrupamiento con 99% del valor *Bootstrap*, se encuentran todas las especies del género *Cladosporium*. El agrupamiento 5 muestra la relación entre *Trichothecium roseum* y *Bionectria* sp. (Figura 10).



**Figura 10.** Árbol filogenético correspondiente a la relación de los hongos endófitos aislados de lesiones necróticas en *Phaseolus vulgaris* L., en la provincia de Loja. Cornejo, F. 2014.

Los hongos endófitos que forman parte del árbol filogenético corresponden a todos los haplotipos (variaciones de uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN) encontrados.

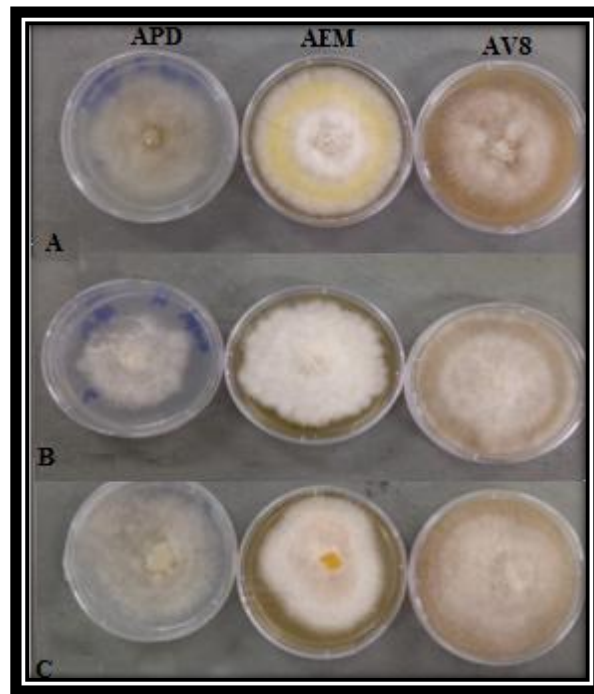
\* Secuencia consenso correspondiente a dos o más hongos pertenecientes a los mismos haplotipos (Tablas 6, 7 y 8).



**Figura 11.** (A) Conidios pertenecientes al género *Epicoccum*. (B) Conidios pertenecientes al género *Boeremia*. Cornejo, 2013.

En el último grupo del árbol perteneciente al filo *Ascomycota* (Agrupamiento 6) se encuentran las especies del género *Fusarium* y la especie *Gibberella moniliformis*. Este último hongo es el anamorfo (estadio reproductivo asexual) de *Fusarium* (Guenther & Trail, 2005; Van Hove, Waalwijk, Logrieco, Munaut, & Moretti, 2011) y por ello su alta relación. Observamos también a miembros del género *Fusarium* enumerados del 1 al 3, este particular se debe a que si bien no se llegó a una identificación molecular específica a nivel de especie por su conocida dificultad en lograrlo con ITS (Schoch et al., 2012), el análisis de sus secuencias y su distinto número de acceso al *Genbank* nos permitió separarlas como tres haplotipos diferentes. Además, en el dendograma podemos notar también diferencias entre ellas, ya que, aunque están dentro del mismo grupo existe una marcada separación. Por ejemplo, vemos que *Fusarium* sp. 2 tiene más similitud con *Fusarium incarnatum*; de igual manera *Fusarium* sp. 3 presenta mayor semejanza con *F. equiseti* y una cercana relación con *Fusarium* sp. 1, pero vemos que sus valores *Bootstrap* son bajos lo cuál nos indica una marcada diferencia entre ellas a pesar de su

cercanía en el árbol. Esta cercanía al árbol se explica por que el clúster conformado por *Fusarium* sp. 2 y *F. incarnatum* constituye el grupo hermano de la agrupación conformada por *Fusarium* sp. 3 *F. equiseti* y *Fusarium* sp. 1 con un valor *Bootstrap* del 96%. Cabe mencionar que estas diferencias no solo fueron a nivel molecular sino también a nivel macroscópico (Figuras 10 y 12).



(A) *Fusarium* sp.1, (B) *Fusarium* sp.2 y (C) *Fusarium* sp.3.

Medios de cultivos utilizados: Agar Papa Dextrosa (APD), Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar V8 (AV8).

**Figura 12.** Características macroscópicas de 3 especies distintas de hongos endófitos pertenecientes al género *Fusarium*. Cornejo, F. 2014.

El grupo (7) perteneciente al filo *Basidiomycota* fue integrado únicamente por *Rhizoctonia solani* (Figura 10).

## CONCLUSIONES

- En la provincia de Loja existe gran diversidad de hongos endófitos relacionados a lesiones necróticas en el fréjol común, debido a los altos valores (1,28) arrojados por el Índice de Shannon y a la presencia de 28 especies distintas.
- En general, los Índices de diversidad (Shannon y Simpson) entre los cantones mantuvieron una relación constante, lo que nos indica una diversidad en equilibrio de hongos endófitos pertenecientes al fréjol común en la provincia de Loja.
- El valor más alto del Índice de Shannon ( $H'$ ) entre los cantones se lo encontró en el cantón Loja (1,06).
- El índice de Simpson ( $D$ ) nos indica la dominancia entre especies presentes en el fréjol. Así, una alta dominancia de ciertas especies produjo una influencia en el bajo valor de  $H'$ . En el cantón Paltas, por ejemplo, se presentó la más baja heterogeneidad y a su vez el valor de  $D$  más alto.
- Los hongos aislados e identificados pertenecen al grupo de endófitos no clavicipitaceous clase 2 y 3 ya que presentaron características de ambos grupos.
- Los géneros más abundantes asociados con lesiones necróticas en *Phaseolus vulgaris* L. fueron *Epicoccum*, *Alternaria*, *Boeremia* y *Fusarium*, especialmente en órganos como hojas y vainas. Dentro de estos géneros las especies *E. nigrum*, *B. telephii*, *A. tenuissima* y *Fusarium* sp. fueron aislados en mayor cantidad.
- Gran parte de los géneros y especies encontrados en este estudio son parte de la microbiota endófito del fréjol común y han presentado, en estudios previos, beneficios como la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas o mejoradoras de las defensas vegetales, siendo así, posibles aliados en la lucha contra patógenos y por ello su relación a lesiones necróticas.



## RECOMENDACIONES

- Para llegar a una identificación más exacta (especie) en ciertos géneros de hongos tales como *Fusarium*, se recomienda amplificar a más de la región ITS otros locus como LSU (Large Subunit), SSU (Small Subunit) o genes codificadores de proteínas.
- Para obtener resultados más diversos se sugiere el uso de métodos libres de cultivo, ya que existen microorganismos viables no cultivables que pueden estar siendo excluidos.
- Hay mucha expectativa en que los hongos encontrados tengan gran potencial biotecnológico, por ello se anima a los futuros científicos e investigadores en el área a un estudio más profundo de estos endófitos.

## REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Londres: Elsevier Inc.
- Aguilera, M., & Silva, J. (1997). Especies y Biodiversidad. *Interciencia*, 22 (6), 299-306. URL: [http://www.interciencia.org/v22\\_06/art02/](http://www.interciencia.org/v22_06/art02/)
- Anita, D., & Sridhar, K. (2009). Assemblage and Diversity of Fungi Associated with Mangrove wild Legume *Canavalia cathartica*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 225-235.
- Arenal, F., Platas, G., Monte, E., & Peláez, F. (2000). ITS sequencing support for *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* being the same biological species. *Mycological Research*, 104, 301–303.
- Arenal, F., Platas, G., & Peláez, F. (2004). Taxonomic reconsideration of *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* based on DNA sequences and morphological observations. *Mycotaxon*, 89, 465-471.
- Arnold, E. (2002). Fungal endophytes in neotropical trees: abundance, diversity, and ecological interactions. En R. Ganeshalah, U. Shaanker, & K. Bawa, *Tropical Ecosystems: Structure, Diversity and Human Welfare* (pp. 739-743). New Delhi: Oxford-ISH.
- Arnold, E., Mejía, L., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., & Robbins, N. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100, 15649–15654. doi: 10.1073/pnas.2533483100
- Arnold, E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungal progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*, 21, 51-66. doi: 10.1016/j.fbr.2007.05.003
- Arnold, E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88 (3), 541-549.
- Aveskamp, M., Gruyter, J., Woudenberg, J., Verkley, G., & Crous, P. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60. doi:10.3114/sim.2010.65.01
- Bailey, K., Falk, S., & Lombardo, S. (2009). *Phoma macrostoma*: a Bioherbicide in the Making. *Sports Turf Manager*, 8, 11-12. Recuperado de <http://archive.lib.msu.edu/tic/stnew/article/2009sum11.pdf>
- Blancard, D. (2014). *Boeremia exigua*. Recuperado de <http://ephytia.inra.fr/en/C/10919/Tobacco-Boeremia-exigua-var-exigua-Ragged-leaf-spot-Phoma-leaf-blight>

- Bottalico, A., Capasso, R., Evidente, A., & Vurro, M. (1994). Process for the production and purification of cytochalasin B from *Phoma exigua* var. heteromorpha. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48, 33-36.
- Brownl, K., Hyde, K., & Guese, D. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity*, 1, 27-51.
- Burmeister, H., Bennett, G., Vesonder, R., & Hesseltine, C. (1974). Antibiotic Produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 5, 634-639.
- Cañizares, J., & Blanca, J. (2011). *Bioinformatica. Grado de Biotecnología*. Recuperado de Filogenias: <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/filogenias.html>
- Carroll, G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69, 2-9.
- Chagas, F., Dias, L., & Pupo, M. (2013). A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 1335-1342. doi: 10.1007/s10886-013-0351-7
- Charles River Laboratories International, Inc. (2014). *Fungal Identification with Fun ITS*. Recuperado de <http://www.criver.com/products-services/rapid-micro/accugenix-microbial-identification-strain-typing/funits>
- D'Elía, G. (2014.). *Sistemática Biológica: Métodos y Principios*. Recuperado de <http://evolucion.fcien.edu.uy/sistemica/Soporteyconsensos.pdf>
- de Gruyter, J., van Gent-Pelzer, M., Woudenberg, J., van Rijswijk, P., Meekes, E., Crous, P., & Bonants, P. (2012). The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 301-313. doi:10.1007/s10658-012-9990-8
- Departamento de Ecología, Genética y Evolución. (2014). *Sistemática y Macroevolución*. Recuperado de [http://www.ege.fcen.uba.ar/materias/evolucion/teoricas/Filogenia\\_I\\_&\\_II\\_PT.pdf](http://www.ege.fcen.uba.ar/materias/evolucion/teoricas/Filogenia_I_&_II_PT.pdf)
- Ding, L., Dahse, H., & Hertweck, C. (2012). Cytotoxic Alkaloids from *Fusarium incarnatum* Associated with the Mangrove Tree *Aegiceras corniculatum*. *Journal of Natural Products*, 75 (4), 617–621. doi: 10.1021/np2008544
- Douanla, C., & Langer, E. (2012). Diversity and molecular phylogeny of fungal endophytes associated with *Diospyros crassiflora*. *Mycology*, 3 (3), 175–187. doi: 10.1080/21501203.2012.705348
- Dudeja, S., Giri, R., Saini, R., Suneja, M., & Kothe, E. (2012). Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic Microbiol.*, 52 (3), 248-260. doi:10.1002/jobm.201100063

- Ernst, M., Mendgen, K., & Wirsel, S. (2003). Endophytic fungal mutualists: Seed-Borne *Stagonospora* spp. Enhance Reed Biomass Production in Axenic Microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 580–587.
- Fishery, P., & Petrini, O. (1992). Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol*, 120, 137-143. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01066
- Flores, C. (2007). *Estandarización del Método de Selección de Gametos en la F1 de Cruzas dobles para Resistencia Múltiple a Enfermedades en Fréjol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Santa Catalina, INIAP, 2006. SANGOLQUÍ.
- Fraile, R., & Oria, J. (2014). *Aproximación al catálogo micológico*. Recuperado de <http://apps.incamedio.com/ojssecforestales/index.php/congresos/article/viewFile/7698/7621>
- Freeman, G., & Morrison, R. (1949). Some Biological Properties of Trichothecin, an Antifungal Substance from *Trichothecium roseum* Link. *Microbiology*, 44 (1), 1-5.
- Freitas, L., & Scussel, V. (2002). Toxigenic Fungi in beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 138-144. doi: 10.1590/S1517-83822002000200008
- Gamboa, M. (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y Perspectivas. *Acta biol. Colomb.*, 11, 3-20. url: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2006000300001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2006000300001)
- Gamboa, M., Laureano, S., & Bayman, P. (2003). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter?. *Mycopathologia*, 156, 41-45. doi: 10.1023/A:1021362217723
- González, A. (2003). Desinfección de semilla de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo granja asturiana con antifúngicos y antibacterianos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29, 461-470.
- Guenther, J., & Trail, F. (2005). The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, 97, 29-37.
- Guesmi, J., Garrido, I., López, C., Halima, M., & Quesada, E. (2014). Establishment of fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Bionectria ochroleuca* (Ascomycota: Hypocreales) as endophytes on artichoke *Cynara scolymus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119, 1-4. doi: 10.1016/j.jip.2014.03.004
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.*, 41, 95-98.
- Hamayun, M., Khan, S., Khan, A., Tang, D., Hussain, J., Ahmad, B., ... Lee, I. (2010). Growth promotion of cucumber by pure cultures of gibberellin-producing *Phoma* sp. GAH7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (5), 889-894. doi: 10.1007/s11274-009-0248-3

- Herre, E., Bael, S., Maynard, Z., & Robbins, N. (2005). Tropical plants as chimera: some implications of foliar endophytic fungi for the study of host-plant defence, physiology and genetics. En D. Burslem, M. Pinard, & S. Hartley (Eds.), *Biotic Interactions in the Tropics: Their Role in the Maintenance of Species Diversity* (pp. 226–240). Cambridge: Cambridge University Press.
- Hibbett, D. (2007). *A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi*. Recuperado de <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/AFTOL/documents/AFTOL%20class%20mss%2023,%2024/AFTOL%20CLASS%20MS%20resub.pdf>
- Hirooka, Y., & Kobayashi, T. (2007). Taxonomic studies of nectrioid fungi in Japan. II: The genus *Bionectria*. *Mycoscience*, 48, 81-89. doi: 10.1007/s10267-006-0331-7
- Hyde, K., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163-173.
- INIAP. (2011). *Leguminosas y Granos Andinos*. Recuperado de [http://www.iniap.gob.ec/~iniapgob/sitio/index.php?option=com\\_content&view=article&id=20:leguminosas&catid=6:programas](http://www.iniap.gob.ec/~iniapgob/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=20:leguminosas&catid=6:programas)
- Institute of Computational Genomics. (2014). *Filogenia*. Recuperado de [http://bioinfo.cipf.es/courses/cefire/lib/exe/fetch.php?media=filogenia\\_curso.pdf](http://bioinfo.cipf.es/courses/cefire/lib/exe/fetch.php?media=filogenia_curso.pdf)
- Jaber, L., & Vidal, S. (2009). Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: do endophytes induce extrafloral-mediated defences in *Vicia faba*? *Functional Ecology*, 9, 707-714. doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01554
- Kortekamp, A. (1997). *Epicoccum nigrum* LINK: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI ? *Siebeldingen*, 36, 215-216.
- León, I. (2009). La antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Temas de Ciencia y Tecnología*, 13 (39), 45-54.
- Marcial, M., Magalhães, K., Silva, C., Dias, D., Duarte, W., & Schwan, R. (2012). Culturable bacteria from soils of the Brazilian Cerrado in Minas Gerais state. *Prime Journal of Microbiology Research (PJMR)*, 2 (6), 153-164.
- Markovskaja, S., & Kacergius, A. (2014). Morphological and molecular characterisation of *Periconia pseudobyssoides* sp. nov. and closely related *P. byssoides*. *Mycol Progress*, 13, 291-302. doi:10.1007/s11557-013-0914-6
- Márquez, L., Redman, R., Rodriguez, R., & Roossinck, M. (2007). A virus in a fungus in a plant – three way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315, 513-515. doi: 10.1126/science.1136237
- Martínez, A., & González, A. (2004). *Aplicaciones de la Bioinformática en la Elaboración de Filogenias Moleculares*. Coruña: Fundación Alfredo Brañas.
- McAleece, N., Gage, J.D.G., Lambshead, P.J.D., & Paterson, G.L.J. (1997). BioDiversity Professional statistics analysis software.

- MCDLab. (2014). *Agar Dextrosa y Papa*. Recuperado de <http://www.electronic-systems.com.mx/pdf/AGAR%20DEXTROSA%20Y%20PAPA.pdf>
- Montoya, C., & Castaño, J. (2009). Microorganismos asociados con granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad cargamento blanco. *Agronomía*, 17, 25-35.
- Morales, V., & Rodríguez, M. (2006). Hongos endofitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.*, 23, 273-283.
- MycoBank. (2014). *Boeremia foveata*. Recuperado de <http://www.mycobank.org/MB/515653>
- Ohtsubo, N., Mitsuhara, I., Koga, M., Seo, S., & Ohashi, Y. (1999). Ethylene Promotes the Necrotic Lesion Formation and Basic PR Gene Expression in MTV-Infected Tobacco. *Plant Cell Physiol*, 12, 808-817.
- Olalde, V., & Aguilera, L. (1998). Microorganisms and Biodiversity. *Terra*, 16 (3), 289-292.
- Otero, J., Ackerman, J., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89 (11), 1852-1858.
- Peña, C. (2011). Métodos de Inferencia Filogenética. *Revista Peru biología*, 18 (2), 265-267. url: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v18n2/pdf/a23v18n2.pdf>
- Peralta, E., Murillo, A., & Pinzón, J. (1997). *Frejol, su Importancia Económica, Ecológica y Social y la Oferta Tecnológica del Programa Nacional de Leguminosas*. Recuperado de [http://www.preduza.org/le1\\_2.htm](http://www.preduza.org/le1_2.htm)
- Peralta, E., Murillo, A., Falconí, E., Mazón, N., & Pinzón, J. (2007). Manual de campo para el reconocimiento y control de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador. Quito, Ecuador.
- Pereira, J., Azevedo, J., & Petrini, O. (1993). Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: A first report. *Mycologia. The New York Botanical Garden*, 85 (3), 362-364.
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. En *Microbial Ecology of Leaves* (págs. 179-197). New York: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-1-4612-3168-4
- Popoff, Orlando. (2007). *Reino Fungi*. Recuperado de <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungi.htm>
- Prado, S., Li, Y., & Nay, B. (2012). Diversity and Ecological Significance of Fungal Endophyte Natural Products. En Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products (Part P)* (pp. 249). Amsterdam: Elsevier.
- Promega-Corporation. (2010). Technical Manual: Wizard® Genomic DNA Purification Kit. *Isolating Genomic DNA from Plant Tissue*. Madison, USA.
- Promptuttha, L., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E., Hyde, K., & Jeewon, R. (2007). A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host

- Senescence. *Microbial Ecology*, 53 (4), 579-590. url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410394>
- Rodríguez, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp. Asociadas a Coffea arabica en Colombia y su aplicación en el diagnóstico de CBD* (Disertación). Recuperado de la Pontificia Universidad Javeriana de la página: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>.
- Rodríguez, E. (2013). *Conceptos básicos de filogenética molecular*. Recuperado de <http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion12.pdf>
- Rodriguez, R., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Redman, R. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal*, 2, 404–416.
- Rodriguez, R., White, J., Arnold, E., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 3, 1-13. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773
- Ron, D., & Santalla. (2001). *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Science Direct*, 3, 1444-1445. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01145-1
- Rosa, L., Tabanca, N., Tehen, N., Wedge, D., Pan, Z., Bernier, U., ... Moraes, R. (2012). Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagated Medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 1105-1114. doi: 10.4236/ajps.2012.38133
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4), 406-425.
- Salgado, C., & Cepero, M. (2005). Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Iberoam Micol*, 22, 99-101. url: <http://www.reviberoammicol.com/2005-22/099101.pdf>
- Sandoval, I., Ofelia, M., & Bonilla, T. (2003). Especies de *Periconia* sobre las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad*, 7, 17-19. url: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209118166004>
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., ... Consortium, F. B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109, 6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? *Soil Biology*, 9, 1-13.
- Schulz, B., Rommert, A., Dammann, U., Aust, H., & Starck, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 1, 1275-1283. doi:10.1017/S0953756299008540

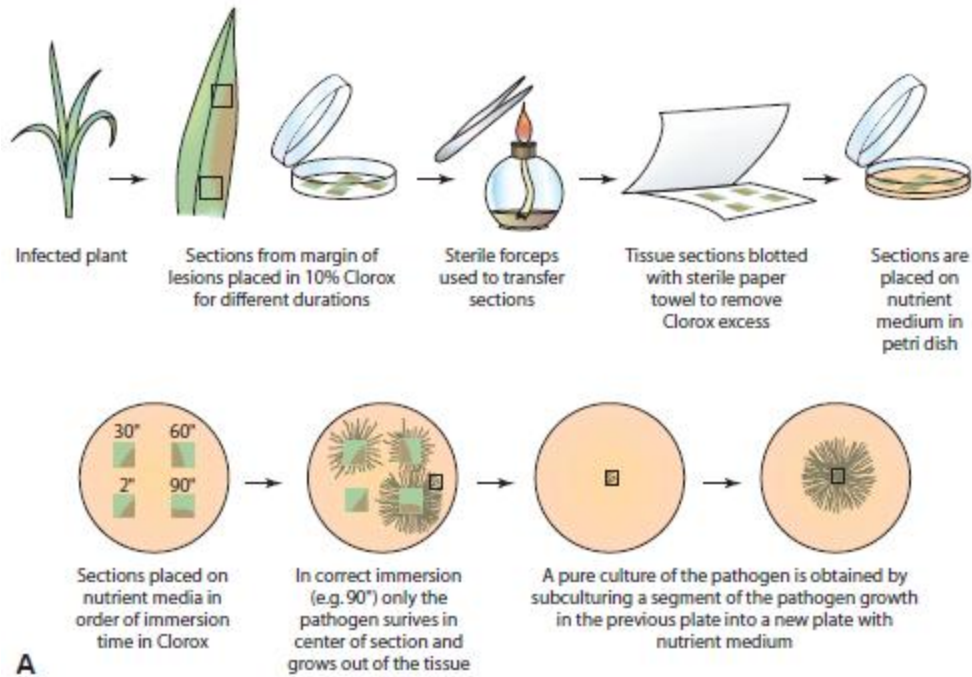
- Seena, S., & Sridhar, K. (2004). Endophytic fungal diversity of 2 sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1015–1021. doi:10.1139/W04-094
- Selim, K., El-Beih, A., AbdEl-Rahman, T., & El-Diwany, A. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Micology*, 1, 31-82. doi: 10.5943/cream/2/1/3
- Sim, J.-H., Khoo, C.-H., Lee, L.-H., & Cheah, Y.-K. (2010). Molecular Diversity of Fungal Endophytes Isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (4), 651–658.
- Snowdon, A. (2010). Pink Mould Rot of tomatoes and egg plants caused by *Trichothecium roseum* Link. En A. Snowdon (Ed.), *Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. London: Mason Publishing.
- Solanas, A., & Sierra, V. (1992). Bootstrap: fundamentos e introducción. *Anuario de Psicología*, 55, 143-154.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Ulloa, J., Ulloa, P., Ramírez, J., & Ulloa, B. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Fuente Año*, 3, 5-9. url: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- Urrutia, M., Angeles, H., Alippi, H., Rollán, C., & Larran, S. (2002). Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigación agraria. Producción y protección vegetales*, 17, 173-178.
- Valcárcel, V. (2014). *Manual para análisis filogenético*. Recuperado de: ¿Qué es una filogenia molecular? [http://ocw.uam.es/cursos/valcarcel/filogenia/1\\_W\\_Text\\_1.pdf](http://ocw.uam.es/cursos/valcarcel/filogenia/1_W_Text_1.pdf)
- Van Hove, F., Waalwijk, C., Logrieco, A., Munaut, F., & Moretti, A. (2011). *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia*, 103 (3), 570-585. doi:10.3852/10-038
- Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2014). Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis. *Acta biológica Colombiana*, 19, 143-154.
- Vasudeva, S., Ravishankar, R., & Lokanatha, R. (2014). *Bionectria ochroleuca* NOTL33—an endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* producing antimicrobial and free radical scavenging metabolites. *Annals of Microbiology*, 64, 275-285. doi: 10.1007/s13213-013-0661-6
- Vieira, M., Hughes, A., Gil, V., Vaz, A., Alves, T., Zani, C., ... Rosa, L. (2012). Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 54-66. doi: 10.1139/W11-105



- Vinuesa, P. (2007). *Método de Distancia y Prueba de Bootstrap*. Recuperado de [http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/curso\\_UFLA07/PDFs/Tema5\\_metodos\\_de\\_distancias\\_y\\_prueba\\_de\\_bootstrap.pdf](http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/curso_UFLA07/PDFs/Tema5_metodos_de_distancias_y_prueba_de_bootstrap.pdf)
- White, T., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press Inc.
- Xiang, S., & Liang-Dong, G. (2012). Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, 3, 65-76. doi: 10.1080/21501203.2012.656724
- Yamada, A., Iritani, B., Ohishi, C., Tanaka, D., Minoura, E., Doi, F., & Numata, G. (2007). Pericosines, antitumour metabolites from the sea hare-derived fungus *Periconia byssoides*. Structures and biological activities. *Organic Biomolecular Chemistry*, 3, 3979-3986.
- Yang, X., Qiu, D., Zeng, H., Yuan, J., & Mao, J. (2009). Purification and characterization of a glycoprotein elicitor from *Alternaria tenuissima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 2035-2042. doi: 10.1007/s11274-009-0105-4
- Zhang, X., Li, G., Ma, J., Zeng, Y., Ma, W., & Zhao, P. (2010). Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi in vitro and its secondary metabolites. *Journal of Microbiology*, 48, 784-790. doi: 10.1007/s12275-010-0173-z

## ANEXOS

### Anexo 1. Cortes de tejidos de plantas y desinfección (Agrios, 2005).



**FIGURE 11-4** Isolation of fungal pathogens from infected plant tissue.

## **Anexo 2. Fórmula y Método de preparación de APD (Agar Papa Dextrosa) (MCDLab, 2014).**

### **Fórmula APD**

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Infusión de Papa    | 200       |
| Dextrosa            | 20        |
| Agar Bacteriológico | 15        |
| pH                  | 5.6 ± 0.2 |

### **Método de Preparación**

Suspender 39 gramos del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C, a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.